

**ESPECIES DE *Fusarium* ASOCIADAS A LA PUDRICIÓN BASAL DEL AJO  
EN EL CENTRO NORTE DE MÉXICO Y SU PATOGENICIDAD**

**JUAN CARLOS DELGADO ORTIZ**

**TESIS  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN  
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARÍA  
“ANTONIO NARRO”  
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA.**

**DICIEMBRE DE 2013**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO**

**ESPECIES DE *Fusarium* ASOCIADAS A LA PUDRICIÓN BASAL DEL AJO  
EN EL CENTRO NORTE DE MÉXICO Y SU PATOGENICIDAD  
TESIS**


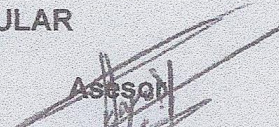
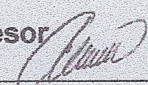
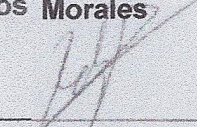
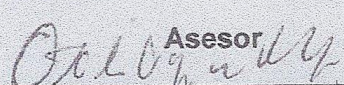
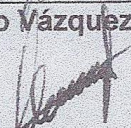
**PRESENTADA POR**

**JUAN CARLOS DELGADO ORTIZ**

**Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y  
aprobada como requisito parcial para optar por el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**COMITÉ PARTICULAR**

Asesor principal	Asesor
 Dra. Yisa María Ochoa Fuentes	 Dr. Gabriel Gallegos Morales
Asesor	Asesor
 Dr. Alberto Flores Olivas	 Dr. Raúl Rodríguez Guerra
Asesor	
 MC. Otilio Vázquez Martínez	
 Dr. Fernando Ruiz Zárate Subdirector del Postgrado	

**Buenavista, Saltillo, Coahuila; México, Diciembre de 2013.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todas y cada una de las personas que me apoyaron y pusieron en mí su confianza; a las personas que me tendieron y me extienden su mano. Sobre todo quiero hacer llegar mi eterna gratitud a la Dra. Yisa María Ochoa Fuentes por ser mentora, consejera, apoyo y amiga.

## DEDICATORIA

Quiero dedicar cada una de las palabras aquí escritas a mi madre Martina Ortiz, a mi padre Félix Delgado†, a mis hermanos y hermanas; y en especial a mi pequeña Mariana. Así mismo quisiera reconocer que gracias a la ayuda, sacrificio y tolerancia de mi pareja Mariana Beltrán pudimos lograr un objetivo más.

**COMPENDIO**

**Especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro norte de México y su patogenicidad**

**POR**

**JUAN CARLOS DELGADO ORTIZ**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARÍA ANTONIO NARRO  
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, DICIEMBRE 2013**

**DRA. YISA MARÍA OCHOA FUENTES –Asesor-**

**Palabras clave: Especies de *Fusarium*, patogenicidad, identificación morfológica, identificación molecular.**

En México la superficie sembrada para el cultivo del ajo es poco menos de 5,452 ha; los estados de Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes aportan más del 66% de la producción nacional, siendo Zacatecas el principal productor a nivel nacional. En el mundo la presencia de hongos, bacterias, virus y nematodos en los sistemas de producción de ajo ocasionan una serie de enfermedades, que dependiendo de la severidad con que se presenten causan un amplio impacto económico. Entre los hongos de suelo que provocan enfermedades en el cultivo de cebolla y ajo se encuentran diversas especies de *Fusarium*, que ocasionan la pudrición basal del bulbo de cebolla (*Fusarium oxysporum* f. s.p. *cepae*) y del ajo (*Fusarium culmorum*); provocando coloraciones café en las puntas de las hojas, que se tornan rojizas o púrpura y que se extienden hasta la base de las hojas, causando enanismo en la planta, bulbos esponjosos y una coloración ocasional purpura, los tallos presentan consistencia blanda y las raíces con coloraciones de color café a rojo. Esta investigación tiene como objetivo identificar morfológicamente y molecularmente las especies de *Fusarium* asociados a la pudrición basal en el centro norte de México y evaluar su patogenicidad. Se realizaron muestreos en las zonas productoras de ajo en los estados de Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes. De estos se aislaron e identificaron morfológicamente hasta el nivel de género con las claves de Barnett and Hunter (1998) mientras que para especie se emplearon las claves de Domsch et al., (1980); Nelson et al., (1983) y Leslie y Summerell, (2006). La identificación molecular se realizó por medio de PCR con iniciadores específicos para cada especie, mientras que las especies que no se identificaron con los iniciadores específicos fueron identificadas mediante los ITS1/ITS4. Lográndose identificar las especies de *Fusarium*: *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. acuminatum* y *F. solani*, de las cuales se evaluó su patogenicidad en invernadero, inoculando plantas las cuales presentaban tres hojas verdaderas con cepas seleccionadas al azar; siendo 5 cepas de *F. oxysporum*, 4 de *F. proliferatum* y 1 de *F. solani* las que mostraron mayor patogenicidad.

**COMPENDIO**

**Especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro  
norte de México y su patogenicidad**

**POR**

**JUAN CARLOS DELGADO ORTIZ**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARÍA ANTONIO NARRO  
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, DICIEMBRE 2013**

**DRA. YISA MARÍA OCHOA FUENTES –Asesor-**

**Palabras clave: Especies de *Fusarium*, patogenicidad, identificación  
morfológica, identificación molecular.**

In Mexico the area planted with the crop of garlic is slightly less than 5,452 ha, the states of Zacatecas, Guanajuato and Aguascalientes contribute more than 66 % of domestic production, being the main producer Zacatecas nationwide. In the world the presence of fungi , bacteria, viruses and nematodes in garlic production systems cause a variety of diseases , depending on the severity with which arise cause a wide economic impact. Between soil fungi which cause diseases in growing onions and garlic are various species of *Fusarium*, basal rot causing onion bulb (*Fusarium oxysporum f sp cepa*) and garlic (*Fusarium culmorum*); causing the coffee stains tips of the leaves, which turn reddish or purple and extending to the base of the leaves, causing stunting plant bulbs occasional fluffy and purple color, have soft consistency stems and roots with a brown coloration red. This research aims to identify morphologically and molecularly *Fusarium* species associated with basal rot in north central Mexico and evaluate their pathogenicity. Were sampled in garlic-producing areas in the states of Zacatecas, Guanajuato and Aguascalientes. These were isolated and identified morphologically to genus level keys Barnett and Hunter (1998) while for species were used keys Domsch et al. (1980 ), Nelson et al. (1983), and Leslie and Summerell, (2006). Molecular identification was performed by PCR using specific primers for each species, while species not identified with specific primers were identified by the ITS1/ITS4. *Fusarium* species identified: *F. oxysporum* , *F. proliferatum* , *F. verticillioides* , *F. solani* and *F. acuminatum*, from which was evaluated in a greenhouse for pathogenicity by inoculating plants which were three true leaves with strains selected at random , being 5 strains of *F. oxysporum*, 4 of *F. proliferatum* and 1of *F. solani* which showed higher pathogenicity.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>PÁGINA</b>
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Origen del ajo.....	3
Producción mundial y nacional del Ajo.....	3
Importancia socio-económica.....	4
Valor nutricional y medicinal.....	5
Principales enfermedades del ajo.....	6
Pudrición blanca.....	6
Moho Azul.....	8
Pudrición por <i>Botrytis</i> .....	8
Mancha púrpura.....	9
<i>Fusarium</i> spp.....	10
Pudrición basal.....	10
<b>ARTÍCULO CIENTÍFICO</b>	
The first report of <i>Fusarium proliferatum</i> causing garlic bulb rots in México.....	13
<b>ARTÍCULO CIENTÍFICO</b>	
Especies de <i>Fusarium</i> asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro norte de México y su patogenicidad .....	22
ANEXOS.....	43

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO</b>		<b>PÁGINA</b>
<b>Tabla 1</b>	Origen de las muestras.....	25
<b>Tabla 2</b>	Cepas empleadas en la prueba de patogenicidad en invernadero.....	28
<b>Tabla 3</b>	Caracterización molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS <sup>1</sup> ) de los genes rDNA de las especies de <i>Fusarium</i> aisladas de semillas de ajo.....	32
<b>Anexo 1</b>	Valores obtenidos en la prueba de patogenicidad en base a la escala propuesta por Velásquez y Medina (2004b).....	43
<b>Anexo 2</b>	Análisis de varianza de las pruebas de patogenicidad en invernadero.....	48
<b>Anexo 3</b>	Prueba de comparación de media de Tukey de las pruebas de patogenicidad en invernadero.....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>		<b>PAGINA</b>
<b>Figura 1</b>	Morphological characters of <i>Fusarium proliferatum</i> .....	18
<b>Figura 2</b>	PCR amplification of AND, from <i>F. proliferatum</i> isolates using primers ITS1/ITS4.....	19
<b>Anexo 4</b>	<i>F. acuminatum</i> .....	51
<b>Anexo 5</b>	<i>F. oxysporum</i> .....	52
<b>Anexo 6</b>	<i>F. solani</i> .....	53
<b>Anexo 7</b>	<i>F. proliferatum</i> .....	54
<b>Anexo 8</b>	<i>F. verticillioides</i> .....	55

## INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es originario de Asia Central, la llegada a América de esta hortaliza fue en el segundo viaje de Cristóbal Colón (Heredia y Delgadillo, 2000). En México, el ajo es considerado como uno de los cultivos más rentables, con 5,539 ha sembradas (FAO, 2011), y con una producción nacional para el año 2012 de 54,015 ton. Los estados que reúnen más del 83% de la producción son Zacatecas, Guanajuato, Sonora, Baja California, Puebla y Aguascalientes. Zacatecas en el 2012 contribuyó con una superficie cosechada de 1,948 ha y 24,820 ton, con un valor de 198'247, 250 pesos (SAGARPA-SIAP, 2012).

La planta de ajo se reproduce asexualmente por lo que su única vía de propagación es mediante bulbillos o dientes, lo cual la hace muy susceptible al ataque de plagas y enfermedades que provocan grandes pérdidas en su rendimiento (Vázquez, 2012). Dentro de los hongos fitopatógenos que afectan al ajo podemos mencionar la pudrición blanca ocasionada por *Sclerotium cepivorum*, moho azul por *Penicillium* spp. y a *Fusarium* spp. Este último afecta al ajo desde su estado de plántula (Quiroz *et al.*, 2008;). *Fusarium* spp. ha sido reportado afectando a plantas de ajo en México en los estados de Guanajuato, Zacatecas y Aguascalientes (Delgadillo, 2000; Velásquez y Medina, 2004a; Ochoa *et al.*, 2012 y Ochoa *et al.*, 2013).

Entre los hongos de suelo que provocan enfermedades en el cultivo de cebolla y ajo se encuentran diversas especies de *Fusarium*, que ocasionan la pudrición basal del bulbo de cebolla (*Fusarium oxysporum* f. s.p. *cepae*) y del ajo (*Fusarium culmorum*). Los daños causados por este género pueden alcanzar el 40% de reducción de rendimientos (Schwartz y Krishna, 1995). En Guanajuato se ha mencionado a *F. oxysporum* como agente causal de pudrición del bulbo; en el estado de Morelos se reportó a *F. culmorum* afectando el cultivo de cebolla (Montes *et al.*, 2003), siendo que Ochoa *et al.*, (2012 y 2013) reporta la presencia de *F. proliferatum*, *F. acuminatum*, *F. verticillioides*, *F. solani* y *F. oxysporum* en semillas de ajo procedentes Aguascalientes, México. Cabe mencionar que en ninguno de los reportes anteriormente citados reportan la patogenicidad de las especies, con excepción de *F. proliferatum* del cual se menciona la aparición de síntomas a partir de la primer semana de inoculación (Ochoa *et al.*, 2013). Por lo antes mencionado el objetivo del presente trabajo es identificar morfológica y molecularmente las especies de *Fusarium* que afectan el cultivo de ajo en los estados de Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes y evaluar su patogenicidad.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Origen del Ajo

El ajo *Allium sativum* L., al igual que la cebolla *Allium cepa* L., es una planta que tuvo su origen en Asia Central, donde el antecesor directo del ajo fue *Allium longicuspis* Regel. Sus propiedades terapéuticas y usos se conocen desde hace más de 3000 años, aunque algunos autores remiten su uso desde 4000 años antes de Cristo (Heredia y Delgadillo, 2000). El ajo fue introducido a lo que hoy día se conoce como América Latina en los últimos años del siglo XIV, durante el segundo viaje de Cristóbal Colón (Reveles y Rubio, 2006; FAO, 1988), comenzando su cultivo en Cuba y de ahí al resto de las colonias. En México se reportan superficies sembradas de esta hortaliza a principios del Siglo XX en la región del Bajío, adquiriendo mayor importancia económica hasta mediados de siglo, en donde se tienen registradas las primeras exportaciones de ajo, como resultado de la ventaja comparativa que implica su posibilidad de cosecha en la época del año en la que se registra regularmente una oferta mundial baja (Espinosa *et al.*, 2003).

## **Producción mundial y nacional del Ajo**

La producción mundial de ajo para el 2011 superó las 23'700,000 toneladas; siendo China, la India y Egipto los principales países productores; aportando 19'156,000, 1'057,800 y 295,845 toneladas respectivamente. México ocupa el vigésimo segundo lugar en la producción de ajo con una producción poco mayor a las 58,000 toneladas (FAOSTAT, 2011). En México la superficie sembrada es mayor a 21'901, 000 ha, de las cuales se emplean en el cultivo del ajo poco menos de 5,452 Ha, con un valor mayor a los 699'800,000 millones de pesos; de las cuales los estados de Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes aportan más del 66% de la producción nacional del ajo. Siendo Zacatecas el principal productor a nivel nacional, seguido por Guanajuato, Sonora, Baja California, Puebla y Aguascalientes (SAGARPA-SIAP, 2012)

## **Importancia socio-económica del Ajo**

La producción mundial de ajo y el comercio internacional han venido experimentando un sostenido aumento, como consecuencia del cambio de los hábitos de consumo hacia una alimentación más saludable y del reconocimiento de sus propiedades terapéuticas (Burba, 2006).

El principal uso del ajo es como condimento, particularmente en los platillos de la cocina asiática, latinoamericana, en algunos países de Europa y últimamente en los Estados Unidos. Las presentaciones requeridas por los consumidores son diversas, desde el bulbo del ajo en fresco o seco, en conserva y deshidratado. En México se tiene un consumo aproximado de 500 gramos por persona al año, de los cuales una cifra cercana al 82% se consume en fresco y el 18% a través de diferentes productos derivados de procesos

industriales como aceite, polvo, medicamentos y extractos (Velázquez, 2011; Espinosa *et al.*, 2003).

El cultivo de ajo es de gran importancia socioeconómica para el estado de Zacatecas, ya que se desarrolla en el campo durante otoño-invierno cuando existen pocas alternativas para el empleo en el medio rural pero las actividades de limpieza, selección y empaclado continúan durante el resto del año. La importancia se ve reflejada en la generación de alrededor de 412,300 jornales por ciclo de cultivo (Reveles y Rubio, 2006; Velázquez *et al.*, 2010 y Mena, 2006).

En 2008, México generó 15'530,000 dólares en divisas por la exportación de ajo fresco; mientras que para el 2009 se tuvo una disminución en las divisas generadas por la exportación de este producto por 11'250,000 dólares (SAGARPA-SIAP, 2010).

### **Valor Nutricional y Medicinal**

El ajo no sólo es importante por el uso culinario, también por su valor nutricional y medicinal. Este en estado verde contiene sodio, azúcares, proteínas crudas, celulosas, cenizas y vitaminas. En los bulbos maduros contiene aceite esencial; también, es portador de una sustancia bacteriana denominada fitocida, la cual detiene el desarrollo de las bacterias que causan la tuberculosis, disentería, difteria, cólera y otras enfermedades. Se usa en tratamientos preventivos de la alta presión arterial, arteriosclerosis, catarros, asma y para enfermedades causadas por parásitos intestinales, es expectorante, vermífugo y tónico para los pulmones. Además, en las secreciones de las raíces del ajo se han descubierto sustancias fitocidas que protegen otras plantas contra algunas enfermedades, como lo son: el tizón



tardío de la papa y la bacteriosis en el repollo (Pal y Platt, 1995; Cabrera y Elliot, 1996).

### **Principales enfermedades del cultivo de ajo**

A nivel mundial la presencia de hongos, bacterias, virus y nematodos en los sistemas de producción de ajo ocasionan una serie de enfermedades, que dependiendo de la severidad con que se presenta y de la parte de la planta afectada, tienen un amplio impacto en pérdidas económicas y pueden ocasionar la afectación en la inocuidad de los productos por la presencia directa de estos organismos o bien por la contaminación con agroquímicos (Everhart *et al.*, 2003; Izquierdo, 2006).

Esta hortaliza, al igual que otros cultivos, se ve afectada por la incidencia de enfermedades que reducen el rendimiento y calidad de la cosecha. Aunque se conocen la presencia de enfermedades foliares como la denominada mancha purpura y virosis. Las enfermedades causadas por patógenos que viven en el suelo son las más importantes en la región, reportándose como enfermedades del bulbo y de la raíz las causadas por *S. cepivorum* Berk., *Penicillium* y *Fusarium* sp., (Mendoza, 1999; Velásquez y Medina, 2004b; Arévalo *et al.*, 2002).

### **Pudrición blanca**

La enfermedad conocida como pudrición blanca representa la principal amenaza para los cultivos de ajo y cebolla en los estados de Zacatecas y Aguascalientes. De acuerdo con algunos reportes la enfermedad se reportó en

Zacatecas desde inicios de la década de 1990 (Olvera *et al.*, 1991), la pudrición blanca, afecta solamente a las especies de *Allium* desarrollando estructuras de resistencia que tienen capacidad de sobrevivir en el suelo por más de 20 años (Delgadillo, 2000 y Rojas, 2010). La pudrición blanca afecta directamente al producto comercial (bulbo), causando pérdidas que pueden llegar al 100% (Delgadillo, 2000; Conles *et al.*, 2010 y Rojas, 2010). La pudrición blanca es causada por el hongo llamado *Sclerotium cepivorum* Berk. cuya principal característica es la producción de estructuras circulares negras llamadas esclerocios sobre la superficie de los bulbos de plantas de ajo o cebolla. Estas estructuras, que regularmente miden entre 0.3 y 0.6 mm de diámetro, se pueden encontrar entre el algodóncillo blanco o micelio que cubre los bulbos de las plantas enfermas (Reveles *et al.*, 2009; Velásquez y Amador, 2009 y Velásquez *et al.*, 2011). La función de los esclerocios es la de sobrevivir en el suelo por periodos prolongados, aún sin la presencia de plantas de ajo o cebolla (Davis *et al.*, 2007).

Las hojas más viejas de las plantas de ajo o cebolla que se infectan con este hongo toman una coloración café y van muriendo hasta que solo quedan vivas las hojas más jóvenes de la planta que muestran una coloración verde opaco. En este punto las envolturas externas del bulbo de la plantas enfermas han sido colonizadas por el micelio del hongo y los esclerocios que se produjeron entre el algodóncillo se encuentran listos para ser liberados en el suelo donde podrán permanecer (Velásquez *et al.*, 2011). La pudrición blanca puede presentarse desde el estado de plántula cuando éstas nacen de “dientes” infectados. Los síntomas que se pueden observar en esta etapa son amarillamiento y raquitismo; las plántulas infectadas se caen o tienden en el suelo; al extraerlas se puede observar el tejido invadido por una pudrición húmeda. Generalmente, la muerte de las plántulas infectadas ocurre rápidamente (Velásquez y Amador, 2009).

Conforme las raíces de las plantas de ajo se desarrollan el hongo aumenta su actividad. Sin embargo los síntomas en el follaje no se verán manifestados hasta que el hongo invade el bulbo de la planta (Velásquez y Amador, 2009).

### **Moho azul**

El ataque de esta enfermedad puede originar una reducida emergencia de plántulas, así como pudriciones de los bulbos durante el período de almacenaje, donde puede contaminar hasta el 90% de los bulbos (Hernández *et al.*, 2006). Bajo condiciones experimentales, la enfermedad puede destruir el 50% de los “dientes” antes de la emergencia (APS, 1995). Además de conocerse su presencia afectando ajo, se ha mencionado su incidencia en almácigos y bajo condiciones de campo en el cultivo de cebolla en el estado de Morelos, México (Montes *et al.*, 2003).

Se ha reportado a *Penicillium hirsutum* Dierck como el responsable de la pudrición del “diente” de ajo, pero otras especies del mismo hongo pueden estar involucradas como *Penicillium corymbiferum* (Westling) en Argentina (APS, 1995; Rivas, 1999). Recientemente, Hernández *et al* (2006) reportaron la patogenicidad de *Penicillium citrinum* Thom. sobre “dientes” de ajo. Los síntomas de la enfermedad en el campo incluyen una pudrición de la “semilla” después de la plantación, lo que resulta en plantas marchitas, cloróticas, débiles o achaparradas, a esta enfermedad se la ha denominado “pérdida de vigor” en otras áreas productoras de ajo como el bajío. En Aguascalientes y Zacatecas la enfermedad parece asociada con los “dientes” que germinan tardíamente. La característica distintiva de la enfermedad es el desarrollo de micelio de color verde azul sobre el “diente” o sus restos. (Velásquez y Medina 2004b; Chávez, 2010).

## **Pudrición por *Botrytis***

La presencia de esta enfermedad ha sido registrada en Noruega, Finlandia, Bulgaria, Hungría, Alemania, Inglaterra, Brasil, Nueva Zelandia, Estados Unidos de América y Canadá. Se ha reportado también que las pérdidas causadas en el cultivo de ajo pueden ser del 30% o mayores (Velásquez y Amador, 2009).

El organismo responsable de esta enfermedad es el hongo *Botrytis porri* Buchw., (APS, 1995; Somerville *et al.*, 1984). Los síntomas foliares asociados a la enfermedad se manifiestan inicialmente en las hojas más viejas tornándose de una coloración amarilla o café, posteriormente las hojas más jóvenes también se secan y solamente las hojas emergentes conservan su color verde. En California se ha mencionado que las plantas de ajo afectadas por éste patógeno son también achaparradas y se advierte marchitez del follaje; los bulbos presentan un aspecto “chupado” y son muy ligeros (Somerville *et al.*, 1984).

## **Mancha púrpura**

Esta enfermedad, ocurre muy esporádicamente en Aguascalientes y Zacatecas aunque los productores de ajo de esa región realizan aspersiones de fungicidas destinadas a “prevenir” la incidencia de la mancha púrpura. En México se le ha reportado previamente en Morelos, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Oaxaca, Puebla, Tamaulipas y Zacatecas (Mendoza y Pinto, 1985; Mendoza, 1999). El hongo responsable de esta enfermedad es *Alternaria porri* Ellis Ciferri, en cuanto a los síntomas que se presentan en esta enfermedad es un gran número de pequeños puntos blanquecinos que se desarrollan concéntricamente. Después de dos a cuatro días estos puntos concéntricos se

tornan de color rojo vino hasta que finalmente aparece una coloración púrpura en su parte central y amarillenta o rojiza en el borde de la lesión. Sobre estas manchas se forman las conidias del hongo; si las condiciones favorecen la epidemia, las manchas en las hojas se unen provocando la defoliación, mientras que las lesiones en los tallos pueden estrangularlos. Las escamas llegan a oscurecerse y se desecan (Delgadillo, 2001; Mendoza, 1996).

### ***Fusarium spp***

El género *Fusarium* es el agente causal del marchitamiento vascular, enfermedad que afecta a una gran variedad de cultivos tales como: ajo, algodón, arveja, banano, brócoli, calabacita, cebolla, chile, fresa, linaza, melón, ornamentales, clavel, crisantemo, gladiolos, tulipanes, repollo, tomate económicamente importantes alrededor de todo el mundo (Ortodena *et al.*, 2004). El gran número de especies y poblaciones no identificadas en este género se debe al alto grado de variación en sus características morfológicas y fisiológicas, y esto explica la capacidad que tiene *Fusarium* para colonizar variados nichos ecológicos en distintas áreas geográficas (Díaz de Castro *et al.*, 2007).

### **Pudrición basal**

Económicamente este patógeno es importante alrededor de todo el mundo (Ortodena *et al.*, 2004; Agrios, 2005). Las pérdidas provocadas por la enfermedad llamada pudrición basal causada por el patógeno *Fusarium spp* pueden alcanzar hasta el 40% en condiciones específicas. El hongo puede causar la pudrición de la semilla aunque en plantas adultas los primeros

síntomas pueden observarse como deformaciones, amarillamiento y necrosis de las hojas (Velásquez, 2004; Amador, 2009). Este patógeno ya ha sido reportado afectando a plantas de ajo en México con anterioridad en los estados de Guanajuato, Zacatecas y Aguascalientes. (Delgadillo, 2000 y Velásquez y Medina, 2004b).

En Guanajuato se ha mencionado *F. oxysporum* como agente causal de pudrición del bulbo. Esta enfermedad ha sido reportada en varias áreas productoras de ajo en el mundo; en México su presencia se ha reportado previamente en los estados de Puebla y Guanajuato (Delgadillo, 2000; Alvarado, 1987). *F. oxysporum* puede ser transportado por la semilla, partículas del suelo, restos infectados del cultivo así como el agua excedente del riego. Las plantas afectadas por la enfermedad se pueden encontrar formando manchones bien definidos en el campo, amarillamiento y muerte regresiva de las puntas de las hojas, mostrando raíces de color café o rosa oscuro con crecimiento de micelio blanco en la base de los bulbos. Se sabe que las razas de este patógeno que atacan al ajo no son capaces de dañar a las plantas de cebolla; sin embargo sí son capaces de afectar a cultivos de cereales. (Velásquez y Medina, 2005; Delgadillo, 2000).

Además se ha observado que los bulbos de las plantas afectadas, no alcanzan a diferenciar completamente sus “dientes” aun cuando los bulbos alcanzan un tamaño normal. Al ser presionados con la mano, los bulbos afectados tienen una consistencia esponjosa, por lo que se les conoce como “ajos de hule”. En Aguascalientes, este síntoma se ha observado con mayor frecuencia hacia la época de cosecha (Velásquez y Medina, 2004b), también es posible que este patógeno puede afectar a plantas de ajo durante su crecimiento en campo (Stankovic *et al.*, 2007).

*F. proliferatum* ha causado enormes pérdidas en la agricultura debido a su amplia variedad de hospederos. Este patógeno tiene importancia económica

ya que se ha encontrado afectando a cultivos como el arroz, maíz, plátano, sorgo, esparrago, pinos, palmeras, cebolla (Leslie y Summerell, 2006; Galván *et al.*, 2008). Este patógeno se encontró afectado a ajo en el noreste de los Estados Unidos, (Dugan *et al.*, 2007), Egipto (Galand *et al.*, 2002), Polonia, Serbia (Stankovic *et al.*, 2007; Stepien *et al.*, 2011) la India (Ravi-Sankar, 2012), España (Palmero *et al.*, 2012) y en México (Ochoa *et al.*, 2013).

Aunque se han logrado avances en la identificación de muchos hongos, aún existen dificultades para el adecuado reconocimiento de ciertos géneros y especies de este grupo de organismos. En Aguascalientes, México; zona productora importante de ajo se han logrado identificar cuatro especies de *Fusarium* afectando a semillas de ajo, reportando a *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. proliferatum* este último ha sido su primer reporte en México, ya que esta especie había sido encontrada afectando al género *Allium* en otra partes del mundo (Ochoa *et al.*, 2012; Ochoa *et al.*, 2013). Para *F. verticillioides* es más frecuente la afectación en cereales aunque en Aguascalientes, México se reporta a este patógeno en semillas de ajo (Ochoa *et al.*, 2012).

## THE FIRST REPORT OF *FUSARIUM PROLIFERATUM* CAUSING GARLIC BULB ROTS IN MEXICO

**Abstract.** Garlic bulbs were collected in the North of Aguascalientes, Mexico. The plant pathogens were isolated, purified and identified down to its species, based on taxonomic keys. Their identity was confirmed by ITS and Pathogenicity tests were conducted under laboratory conditions. *Fusarium proliferatum* was identified by the pathogenicity tests. The fungus was isolated from the bulb and stem parts presenting purple and reddish lesions. This is the first report *F. proliferatum* in garlic in Mexico; although it had already been reported for garlic in Spain, Serbia, USA and Germany.

**Key words:** Identification, rot of bulbs, *Allium sativum*.

### INTRODUCTION

Garlic is considered one of the most profitable crops in Mexico, with a planted surface area of 5 654 ha (FAO, 2009) and a domestic production in 2009 of 56 088 ton. Eighty seven percent of garlic production is concentrated in the states of: Zacatecas, Guanajuato, Baja California, Aguascalientes and Sonora (INEGI, 2010). In these regions, fungal diseases are the main cause of huge economic losses, including white rot, by *Sclerotium cepivorum* Berk, and diseases such as *Botrytis* spp, *Sclerotium rolfsii*, *Penicillium* spp and *Fusarium* spp (Velásquez and Medina 2004a). *Fusarium* spp has shown stronger presence in the last eight years, after Vázquez and Medina reports (2004b) of a new symptomatology called garlic bulb rot in cultivars at Aguascalientes and Zacatecas. Rot of bulbs by *Fusarium* spp, has become a limiting factor to garlic and onion production in different growing areas, including not only in Mexico, but



also countries like Argentina, considered the 4th largest garlic producer in the world (Kiehr y Delhey, 2005). *Fusarium* spp has a broad range of hosts. In the alliaceae family, *Fusarium* ssp damages onion seedlings with damping-off, besides attacking garlic under storage conditions. *Fusarium* spp, is widely distributed in the world and is among soil-borne fungi that attack garlic and onion causing rot of onion bulbs (*Fusarium oxysporum f sp cepae*) and in garlic (*Fusarium culmorum*). Damage caused by this pathogen can produce 45% less yield (Schwartz y Mohan, 1995). Recently, *Fusarium proliferatum* developing internal rot, white mycelium, bulbs and reddish stems has been found to be the cause of garlic bulb rot, in Spain, Serbia, USA and Germany (De Cara et al., 2010; Stankovic et al., 2007; Dugan et al., 2003; Seefelder et al., 2002). Considering the importance of the disease in garlic growing regions, this work aimed to confirm the presence of *Fusarium proliferatum* in Aguascalientes, Mexico, as the cause of garlic bulb rot.

## **METHODS AND MATERIALS**

**Sampling.-** Garlic plots were sampled in the North of Aguascalientes during February-May, as well as in August-September 2011. 12 plants presenting symptoms of the disease and tree asymptomatic apparently healthy plants were sampled at random from ten plots. Bulbs were collected during sampling process in August and September.

**Fungus isolation from bulbs and plants.-** The isolation process begun by cleaning the tissue of diseased plants with an alcohol-impregnated cotton ball at 70%. Small incisions were cut at the disease leading edge, where the pathogen was developing actively. Sample tissues were disinfected with a hypochlorite sodium solution at 1% for 3 minutes, before being rinsed with sterilized water and placed in Petri dishes with PDA medium, aditioned with

streptomycin (100 ppm). The dishes were incubated at 25 °C  $\pm$  2 for 7 days until obtaining pure cultures.

**Identification.-** After seven days, mycelia and spores were mixed into a suspension that was observed under the microscope to identify the gender using Barnett and Hunter (1998) keys. *Fusarium* species were identified using the keys of Domsch et al., 1980; Nelson et al., 1983; Leslie and Summerell, 2006.

**Species Identification.-** A small fragment of the colony was taken from monoconidial cultures and was transferred to the center of Petri dishes, containing PDA and SNA. The inoculated dishes were kept at 26°C for 15 days. After 10 days, the diameter of the colonies was measured in PDA and after 15 days the SNA inoculated dishes were opened to observe the microscopic characteristics of the colonies. The microscopic analysis was done using a Leica microscope (ATC 2000) enlarged at 60X, 150X and 600X. The identification was mainly based on the structure, composition and ultra-structure of conidial cells, conidiophores and chlamydospores, using the keys of Domsch et al. (1980); Nelson et al. (1983) and the laboratory handbook of Leslie and Summerell (2006).

**Molecular identification.-** DNA extraction was done using Doyle and Doyle method (1990). The extraction product was analyzed in agarose gel at 1% through electrophoresis before amplifying transcribed ITS1 and ITS4 internal regions by polymerase chain reaction (PCR), among ribosomal genes (rDNA) 18S- 5.8S and 5.8S- 28S, using the pair of sequence: ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) adding to each sample an enzyme buffer, at 1x, 1  $\mu$ l; dNTP's at 0.2 mM, 1  $\mu$ l; MgCl at 2 mM, 0.4  $\mu$ l; ITS1 at 1 pM, 0.5  $\mu$ l; ITS4 at 1 pM, 0.5  $\mu$ l; 0.5 UDO of Taq polymerase, 0.1  $\mu$ l; DNA adjusted problem at 50ng, 1  $\mu$ l; and 5.5  $\mu$ l of ultra-pure sterile water to adjust the final volume at 10 $\mu$ l. PCR reaction conditions were the following ones: 1 cycle of initial de-naturalization at 94°C for 5min, 30 cycles

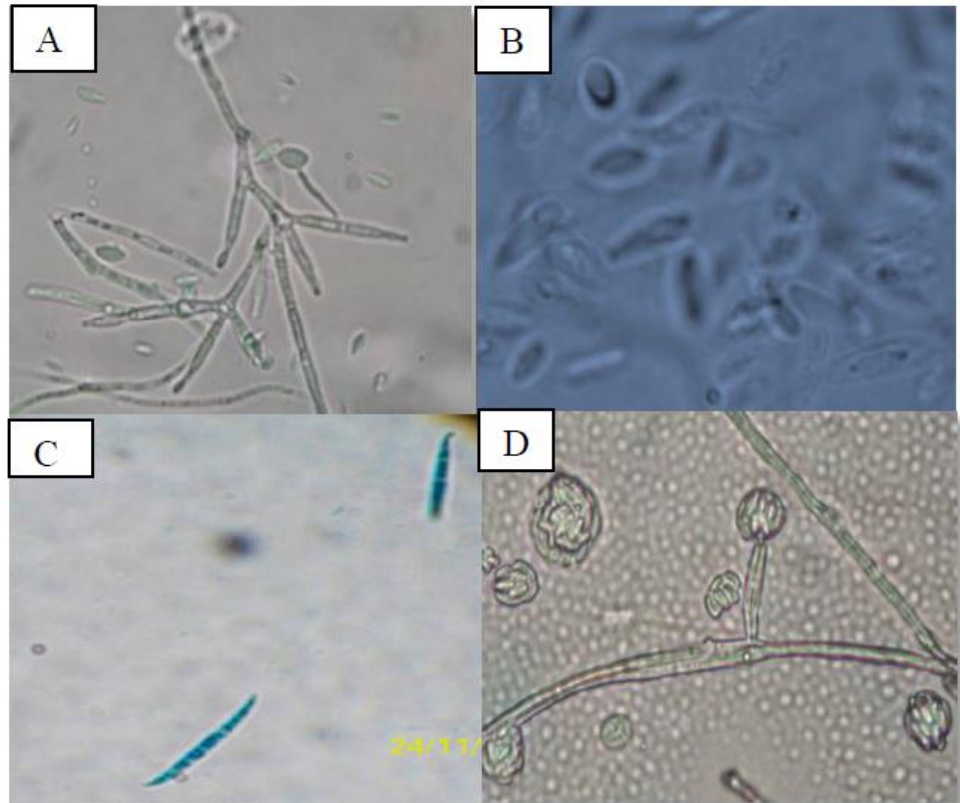
of de-naturalization at 95°C for 10 seconds, 30 cycles of alignment at 57°C for 30 seconds, 30 cycles of extension at 72°C for 2 min. and 1 cycle of final extension at 72°C for 5 min. The amplification was analyzed in agarose gel at 1% through electrophoresis. PCR resulting product was purified using In vitro gen PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit, sequenced in two directions (5' to 3' and 3' to 5') with automatic sequencer. Base pairs obtained were compared with the sequences reported in the data base of NCBI's gens bank (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)).

**Pathogenicity in vitro essays.-** Twelve in vitro grown plants in (MS medium) with three leaves were injected with treatment around the basal area using a syringe ( where the color changes from white to green) with a spores concentration of  $10^6$  conidia/ mL-1 sterile distilled water, while the control were inoculated only with sterile distilled water. The plants were grown and incubated at 25°C with 12 h light conditions. After the appearance of the symptoms, the tissue was dissected 21 days later in order to recover the inoculated fungus.

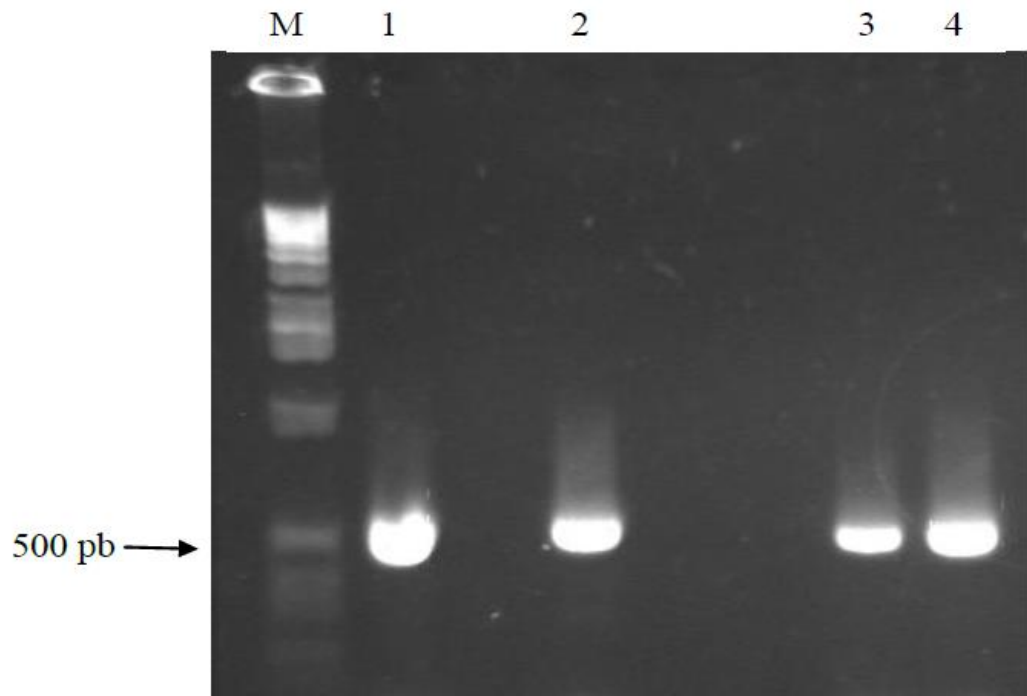
## **RESULTS AND DISCUSSION**

The presence of *F. proliferatum* was determined, forming abundant single-cell microconidia, rod-shaped with flat base, sometimes resembling a pear. These microconidia formed chains and false heads. Some of them had three to five relatively thin septae, with thin walls and curved apical cells, as well as monophialides and polyphialides (Figure 1). These observations coincide with the reports of Nelson et al. (1983) and Leslie & Summerell (2006), who mentioned that *F. proliferatum* forms chains of flat-base single-cell hyaline microconidia with polyphialides and monophialides; curved macroconidia with three to five thin septae, slightly curved, with curved apical cell and little

developed basal cell. The identity of the cells was confirmed through ITS-PCR technique, where the amplified products yielded around 500 pb (Figure 2). The sequences were aligned according to Gen Bank data base of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) from USA ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). From the values produced, only the sequences with the highest value for comparison purposes were lowered. The presence of *F. proliferatum* was determined, with Access number NCBI HQ113948.1 and a similarity ratio of 99 to 100%, from Chinese origin. A week after the artificial inoculation, the plants presented pink to brown basal lesions that turned gray-brown and finally necrotic. Fungi from plants presenting herein above mentioned symptomatology were re-isolated, obtaining *F. proliferatum* consistently. The control check did not show any symptoms. *F. proliferatum* is an important pathogen producing huge losses in agriculture, due to its broad range of hosts. This plant pathogen has economic importance since it affects crops such as rice, corn, banana, sorghum, asparagus, pine trees, palm trees, etc (Leslie and Summerell, 2006), onion (Galvan et al., 2008) and garlic (Dugan et al., 2003). *Fusarium oxysporum* and *Fusarium proliferatum* caused meaningful losses during 2005 and 2006 in USA's National Germplasm Bank (Dugan et al., 2007). In Europe, *F. proliferatum* was isolated from onion seeds (Mannerucci et al., 1987) and was reported as the main plant pathogenic agent affecting garlic bulbs in Hungary (Simey,1990). This fungus has also been reported in Spain, Serbia, USA and Germany in garlic bulbs, as the cause of garlic bulb rots (De Cara et al., 2010; Stanovic et al., 2007; Dugan et al., 2003; Seefelder et al., 2002). This is the first report of rot of garlic bulbs caused by *Fusarium proliferatum* in Mexico.



**Figure 1.** Morphological characters of *Fusarium proliferatum*. A, Phialids and microconidia; B, microconidia; C, macroconidium; D, monophialid with false head.



**Figure 2.** PCR amplification of DNA, from *F. proliferatum* isolates using primers ITS1/ITS4. Lane M, Molecular weight marker; Lanes 1, 2, 3 and 4, isolates from *F. proliferatum*

## REFERENCES

Barnett HL, Hunter BB (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. APS Press, Minnesota. 240 pp.

De Cara M, Iglesias C, Moreno MM, González N, Tello JC (2010). First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in Spain. Plant disease, Vol 94 No 2. 277 p.

Domsch KH, Gams W, Anderson H (1980). Compendium of soil fungi Vol 1. Academic Press- London -UK, New York. 905 pp.

- Doyle JJ, Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15 pp.
- Dugan FM, Hellier BC, Lupien SL (2003). First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathology* 52: 426.
- Dugan FM, Hellier BC, Lupien SL (2007). Pathogenic fungi in garlic seed cloves from the United State and China, and Efficacy of Fungicides Against Pathogens in garlic germplasm in Washington State. *Journal of Phytopathology*, 155: 437-445.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. Production garlic 2009 data. Statistics Division, FAOSTAT.
- Galván G, Koning C, Koopman W, Burger K, González P, Waalwijk C, Kik C, Scholten O.E (2008). Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion, and resistance to *Fusarium* basal rot in related *Allium* species. *European Journal of Plant Pathology*. 121: (4).499 – 512.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) (2010). Anuario estadístico de Aguascalientes 2010.
- Kiehr M, Delhey R (2005). *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum* como causa de podredumbre basal y muerte de plántulas de cebolla, en el sur argentino. XII Congreso Latinoamericano- XXVIII Congreso Argentino de Horticultura, Argentina pp. HV13.
- Leslie JF, Summerell BA (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, USA.369 p.

- Mannerucci CF, Cristani C, Marziano F, Gambogi P (1990). Specie di *Fusarium* in seme di Cipolla di produzione nazionale. *Phytopathologia Mediterranea* 26: 156-164.
- Nelson P, Toussoun T, Marasas W (1983). *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. Universidad de Pensilvania. 40pp.
- Schwartz HF, Mohan K (1995). Compendium of onion and garlic diseases. Academic Press. San Diego California. 54 p.
- Seefelder W, Gossmann M, Humpf HU (2002) Analysis of fumonisin B1 in *Fusarium proliferatum* infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 2778-81.
- Simey EI (1990) Garlic rot caused by *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg var. *Minus Nirenberg* in Hungary. *Novenyvedehem.* 26: 397-399.
- Stankovic S, Levic J, Petrovic T, Logrieco A, Moretti A (2007). Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 118:165-172.
- Velásquez VR, Medina AMM (2004a). Guía para conocer y manejar las enfermedades más comunes de la raíz de ajo en Aguascalientes y Zacatecas. Folleto para productores No 34. Campo Experimental Pabellón-CIRNOC-INIFAP. Aguascalientes, Aguascalientes, México. 18 p.
- Velásquez VR, Medina AMM (2004b). Características Vegetativas y susceptibilidad de variedades de ajo (*Allium sativum*) infectadas por *Fusarium* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología.* Vol 22 No 3. 35-438 pp.



## ESPECIES DE *FUSARIUM* ASOCIADAS A LA PUDRICIÓN BASAL DEL AJO EN EL CENTRO NORTE DE MÉXICO Y SU PATOGENICIDAD

### RESUMEN

El ajo en México es una de las hortalizas más rentables, cultivándose 5,451ha aproximadamente; de las cuales más del 83% de la superficie es aportada por los estados de Zacatecas, Guanajuato, Sonora, Puebla, Baja California y Aguascalientes. De las principales enfermedades de origen fungoso que causan daños de importancia económica al cultivo destacan la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), y enfermedades como *Botrytis* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. La pudrición basal ocasionada por *Fusarium* spp, se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, se ha convertido en una limitante en zonas productoras de cebolla y ajo, no solo en México, también en países como Argentina quien es el cuarto productor de ajo a nivel mundial. Siendo que en México, existen antecedentes de *F. oxysporum* en Guanajuato y Aguascalientes, en el estado de Morelos se ha reportado a *F. culmorum* en cultivares de cebolla, además que en Aguascalientes se tienen antecedentes de otras especies como: *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani* y *F. acuminatum*. Mientras que en Zacatecas solo se percibido la presencia del genero *Fusarium* en el cultivo de ajo. Para este trabajo se planteó como objetivo identificar morfológica y molecularmente las especies de *Fusarium* encontradas en los estados de Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes; y evaluar la patogenicidad de cada una de las especies encontradas. De los muestreos realizados se identificaron las siguientes sepas: *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani* y *F. acuminatum*. Siendo las más patogénicas bajo condiciones de invernadero AGS1, ZAC54B, GTO2D, AGS4A y ZAC13A (*F. oxysporum*); AGS4C, AGS8A, ZAC54A y GTO13A-1 (*F. proliferatum*) y GTO54A (*F. solani*).

**Palabras clave:** Ajo, Fusarium, patogenicidad, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani* y *F. acuminatum*.

## INTRODUCCION

El ajo en México es una de las hortalizas más rentables, cultivándose 5,451ha aproximadamente; de las cuales más del 83% de la superficie fue aportada por los estados de Zacatecas, Guanajuato, Sonora, Puebla, Baja California y Aguascalientes (SAGARPA-SIAP, 2012). Las principales enfermedades de origen fungoso que causan daños de importancia económica al cultivo destacan la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk), sin embargo se presentan enfermedades como *Botrytis* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. (Velásquez y Medina 2004a), esta última ha presentado mayor presencia durante los últimos años como lo menciona Velásquez y Medina (2004b). *Fusarium* es un género que cuenta con especies patogénicas y especializadas, responsables de enfermedades en cultivos específicos (Leslie y Summerell, 2006). La pudrición basal ocasionada por *Fusarium* spp, se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, se ha convertido en una limitante en zonas productoras de cebolla y ajo, no solo en México, también en países como Argentina quien es el cuarto productor de ajo a nivel mundial (Kiehr y Delhey, 2005). Los resultados de Velásquez y Medina (2004b) de muestreos en parcelas cultivadas con ajo perla y ajo morado, los condujeron a concluir que *Fusarium* spp. fue el agente causal de la enfermedad pudrición basal, la cual se manifiesta con coloraciones café en las puntas de las hojas, tornándose rojiza o púrpura las cuales lograron extenderse hasta la base de las hojas, enanismo en la planta, bulbos esponjosos y con una ocasional coloración purpura, tallos de consistencia blanda y raíces con coloraciones de color café a rojo. Algunas de las sintomatologías antes mencionadas han sido

reportadas para *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. culmorum*, *F. solani* y *F. acuminatum* en Estados Unidos, Turquía, Venezuela, Uruguay y Países Bajos, Japón, Serbia, España, México (Martínez *et al.*, 1995; Cramer, 2000; Dugan *et al.* 2003; Montes-Belmont *et al.*, 2003; Stankovic *et al.*, 2007; Galván *et al.*, 2008; Dissanayake *et al.*, 2009; Bayraktar *et al.*, 2010; Palmero *et al.*, 2012 y Ochoa, *et al.*, 2012). La producción basal del bulbo de cebolla (*Fusarium oxysporum* f sp cepae) y del ajo (*Fusarium culmorum*) (Schwartz y Mohan, 1995), pueden presentar daños por damping-off o reducción en la germinación de la semilla (Dissanayake *et al.*, 2009); llegando a causar daños de 40% en la reducción de rendimientos (Schwartz y Mohan, 1995).

Ochoa, *et al.* (2012) al muestrear semillas de ajo originarias de Aguascalientes, México; identificaron morfológica y molecularmente mediante ITS a *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. acuminatum* y *F. verticillioides*; mas no se evaluó la patogenicidad de las cepas encontradas. Por lo que es fundamental establecer la patogenicidad de las cepas que están afectando el cultivo. Por lo anterior, para este trabajo se planteó como objetivo identificar morfológica y molecularmente las especies de *Fusarium* encontradas en los estados de Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes; así como evaluar la patogenicidad de cada una de las especies encontradas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS:**

**Muestreo.** La recolecta del material se realizó en los estados de Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes; en este último se realizaron en el mes de enero 2013. En el mes de marzo 2013 se muestrearon de Zacatecas y Guanajuato (Tabla 1). Se recolectaron de cada una de las parcelas 12 plantas con síntomas de la enfermedad y tres aparentemente sanas.

Tabla 1. Origen de las muestras.

Número de localidad	Estado	Municipio
1	Zacatecas	Veta Grande
2	Zacatecas	Guadalupe 1
3	Zacatecas	Guadalupe 2
4	Zacatecas	Villa de Cos 1
5	Zacatecas	Villa de Cos 2
6	Zacatecas	Panuco
7	Zacatecas	Fresnillo
8	Zacatecas	Calera 1
9	Zacatecas	Calera 2
10	Zacatecas	Gral. Enrique Estrada
11	Guanajuato	Comonfort
12	Guanajuato	Celaya
13	Guanajuato	Cortazar 1
14	Guanajuato	Cortazar 2
15	Aguascalientes	Rincón de Romos
16	Aguascalientes	Rincón de Romos
17	Aguascalientes	Rincón de Romos

**Aislamiento.** Se realizaron pequeños cortes de la zona de avance de la infección (raíces con tejido con coloración café o rojiza), donde el patógeno se encontraba en activo desarrollo, desinfectados con hipoclorito sodio al 1% durante 3 minutos, y se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril y sembrados en placas de petri con medio PDA adicionado con ácido láctico (200  $\mu$ L de ácido láctico al 85 %). Las placas fueron incubadas a 27 °C  $\pm$  2 por 7 días, en función de los tipos y coloraciones de micelio desarrollados fueron el número de cultivos puros. Los cultivos puros en PDA, fueron incubados a 27 °C  $\pm$  2.

**Identificación a género.** La identificación a género se basó en la estructura, composición de las células conidiales, conidioforos y clamidosporas de las claves de Barnett y Hunter (1998).

**Obtención de cultivos monoconidiales.** Posterior a la identificación a género, se elaboraron cultivos monoconidiales. Obteniendo una suspensión de conidios que fue dispersada en placas con medio PDA. A las 24 h cuatro conidios germinados fueron transferidos a PDA. Las colonias monoconidiales fueron transferidas al medio de cultivo Spezieller Nährstoffmarmmer Agar SNA (1.0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0 g de  $\text{KNO}_3$ , 0.5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g de  $\text{KCl}$ , 0.2 g de glucosa, 0.2 g de sacarosa y 20 g de agar en un litro de agua destilada) y fueron mantenidas para su conservación bajo condiciones de laboratorio. A partir de estas colonias se llevó a cabo la identificación de especies.

**Identificación a especie.** La identificación a especie se realizó a partir de placas de SNA para la observación de características microscópicas de las colonias. La identificación se basó en el manual de laboratorio de Leslie y Summerell (2006).

**Identificación molecular.** La extracción de DNA se realizó mediante el método de Doyle y Doyle modificado (1990). Se raspó el micelio de *Fusarium spp* de una caja de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar. 0.2 g de micelio se pesaron y maceraron con una varilla esmerilada los cuales fueron resuspendidos en 500  $\mu\text{L}$  de regulador de extracción (Tris-HCl, pH 8.0 100 mM, EDTA pH 8.5 50 mM, NaCl 50 mM y SDS 2 %), fueron agitados en un vortex durante 30 s, y se dejaron reposar en hielo por 15 min. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  cloroformo alcohol isoamílico 24:1 y se agitó en un vortex para posteriormente centrifugarse a 12,000 rpm durante 15 min, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se le adicionó el mismo volumen de isopropanol, se dejó reposar por 15 min en hielo para posteriormente centrifugar a 12,000 rpm durante 10

min, se desechó el sobrenadante y se recuperó la pastilla, la cual fue resuspendida en 50 µL de agua desionizada estéril. Se agregaron 10 µL de RNAsa y se incubó a 37°C por 1 h, finalmente se determinó la concentración de ADN y se diluyó este hasta obtener la concentración de ADN adecuada para la reacción de PCR.

Para la identificación de las diferentes especies de *fusarium* obtenidas, se utilizaron iniciadores específicos para cada una de las especies identificadas morfológicamente; los iniciadores para *F. oxysporum* fueron CLOX1 (5'-AGCAAAGCATCAGACCACTATAACTC -3') y CLOX2 (5'-CTTGTCAGTAACTGGACGTTGGTACT -3'), para *F. acuminatum* fueron FACF (5'-GGGATATCGGGCCTCA -3') y FACR (5'-GGGATATCGGCAAGATCG -3'), mientras que para *F. verticillioides* se emplearon los iniciadores VERT 1 y VERT2 respectivamente (5'-GTCAGAATCCATGCCAGAACG -3') y (5'-CACCCGCAGCAATCCATCAG -3'), mientras que para *F. proliferatum* PRO1 (5'-CTTTCCGCCAAGTTTCTTC -3'); por lo cual para aquellas especies que no se alinearon con los iniciadores específicos, se amplificaron mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con las regiones internas transcritas ITS1 e ITS4 entre los genes ribosomales (rDNA) 18S- 5.8S y 5.8S-28S utilizando el par de iniciadores de secuencia ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) colocando en cada muestra buffer de enzima a 1x, 1 µl; dNTP's a 0.2 mM, 1 µl; MgCl a 2 mM, 0.4 µl; ITS1 a 1 pM, 0.5 µl; ITS4 a 1 pM, 0.5 µl; 0.5 UDO de Taq polymerasa, 0.1 µl; DNA problema ajustado a 50ng, 1 µl; y 5.5 µl de agua ultrapura estéril para ajustar un volumen final de 10µl. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5min, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, 30 ciclos de alineamiento a 57°C por 30 segundos, 30 ciclos de extensión a 72°C por 2 min. y 1 ciclo de extensión final a 72°C por 5 min. La amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. El producto de PCR se purificó con el kit de purificación de bandas de In vitro gen (PureLink®

Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit), y se secuenció en dos direcciones (5' a 3' y 3' a 5') con un secuenciador automático. Los pares de base obtenidos se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)).

**Pruebas de patogenicidad en invernadero.** La producción de plantas en invernadero, se llevó a cabo en el Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes; las semillas de ajo variedad Ensenada fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (3.0%) durante 3 min y se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril, las cuales fueron sembradas en bolsas con sustrato estéril, donde se emplearon cuatro plantas por tratamiento. Los tratamientos consistieron en doce cepas del estado de Guanajuato, once para el estado de Aguascalientes, doce para el estado de Zacatecas y un testigo que fue inoculado con agua destilada estéril bajo condiciones controladas; las cepas fueron seleccionadas aleatoriamente para cada especie encontrada en los tres estados, en la tabla 2 se muestra una lista de las cepas empleadas.

Tabla 2. Cepas empleadas en la prueba de patogenicidad en invernadero

Estado	Cepa	Especie
<b>Zacatecas</b>	ZAC 1 <sup>a</sup>	<i>F. proliferatum</i>
<b>Zacatecas</b>	ZAC 21B	<i>F. proliferatum</i>
<b>Zacatecas</b>	ZAC54A	<i>F. proliferatum</i>
<b>Zacatecas</b>	ZAC 124A	<i>F. verticillioides</i>
<b>Zacatecas</b>	ZAC75 A-2	<i>F. verticillioides</i>
<b>Zacatecas</b>	ZAC 43B	<i>F. verticillioides</i>
<b>Zacatecas</b>	ZAC13A	<i>F. oxysporum</i>
<b>Zacatecas</b>	ZAC54B	<i>F. oxysporum</i>
<b>Zacatecas</b>	ZAC66C	<i>F. oxysporum</i>
<b>Zacatecas</b>	ZAC52A	<i>F. solani</i>

<b>Zacatecas</b>	ZAC23A	<i>F. acuminatum</i>
<b>Zacatecas</b>	ZAC119A	<i>F. acuminatum</i>
<b>Guanajuato</b>	GTO 13 A-1	<i>F. proliferatum</i>
<b>Guanajuato</b>	GTO 10 A-2	<i>F. proliferatum</i>
<b>Guanajuato</b>	GTO 1 B-1	<i>F. proliferatum</i>
<b>Guanajuato</b>	GTO 1A	<i>F. verticillioides</i>
<b>Guanajuato</b>	GTO 10B	<i>F. verticillioides</i>
<b>Guanajuato</b>	GTO 58A	<i>F. verticillioides</i>
<b>Guanajuato</b>	GTO 1D	<i>F. oxysporum</i>
<b>Guanajuato</b>	GTO6B	<i>F. oxysporum</i>
<b>Guanajuato</b>	GTO 2D	<i>F. oxysporum</i>
<b>Guanajuato</b>	GTO 37B	<i>F. solani</i>
<b>Guanajuato</b>	GTO 12A	<i>F. solani</i>
<b>Guanajuato</b>	GTO 54A	<i>F. solani</i>
<b>Aguascalientes</b>	AGS 4C	<i>F. proliferatum</i>
<b>Aguascalientes</b>	AGS 9 A-1	<i>F. proliferatum</i>
<b>Aguascalientes</b>	AGS 8A	<i>F. proliferatum</i>
<b>Aguascalientes</b>	AGS 31 B-1	<i>F. verticillioides</i>
<b>Aguascalientes</b>	AGS 32 B-2	<i>F. verticillioides</i>
<b>Aguascalientes</b>	AGS 8B	<i>F. verticillioides</i>
<b>Aguascalientes</b>	AGS 1A	<i>F. oxysporum</i>
<b>Aguascalientes</b>	AGS 4A	<i>F. oxysporum</i>
<b>Aguascalientes</b>	AGS 1B	<i>F. oxysporum</i>
<b>Aguascalientes</b>	AGS 8 C-1	<i>F. solani</i>
<b>Aguascalientes</b>	AGS Y-10	<i>F. acuminatum</i>

**Preparación de inóculo.-** Para la preparación del inóculo se realizó de la siguiente manera: al micelio de las diferentes cepas se les agregó 50ml de agua destilada estéril y se pasaron a una licuadora para ser molidos y posteriormente ajustar la suspensión de conidias a una concentración de  $10^6$  conidias mL<sup>-1</sup>, esto se realizó con la ayuda de un hemacitometro.



**Inoculación de las plantas.-** La inoculación se llevó a cabo cuando las plantas presentaron tres hojas completamente abiertas, cada planta fue tratada alrededor del cuello (la zona donde cambian de color blanco a verde), y dicho inoculo fue cubierto con sustrato estéril, el testigo se le adicionó agua destilada estéril. Se evaluó la reacción cada 24 horas después de la inoculación, con la finalidad de conocer la severidad de la enfermedad empleada es la escala utilizada por Velásquez y Medina (2004b), la cual consistió en tres puntos: Punto 1. Planta sana Punto 3. Planta con hojas amarillas o rojas, puntas purpuras y/o daño en el cuello de la planta y Punto 5. planta muerta.

## **RESULTADOS y DISCUSIÓN:**

**Identificación morfológica.** De los muestras se pudieron recuperar 147 cepas de género *Fusarium*, de las cuales se logró identificar cinco especies: *F. acuminatum* que presentó macroconidias grandes y delgadas con tres septos; su célula apical cónica estrecha y elongada; la célula basal con forma de pie, pero no tan prominente como otras especies relacionadas; además de presentar cadenas largas o grupos de clamidosporas (anexo 4). *F. oxysporum* la cual presentó micelio de coloraciones desde blanco-violeta y coloraciones en el agar violetas, rosados, amarillas, marrones y en algunos casos llegó a no mostrar pigmentación en el agar. Conidios en falsas cabezas, con monofialides cortas, abundantes microconidias elípticas compuestas por una o dos células, macroconidias con la célula apical cónica y en algunas ocasiones se observó una especie de gancho y la célula basal en forma de pie o en ocasiones pobremente desarrollada y la célula apical redondeadas de tres a cuatro septos, con clamidosporas de textura lisa (anexo 5). *Fusarium solani* exhibió coloraciones blancas, crema y café en el micelio y pigmentaciones de color crema, rosadas y marrón, conidios en falsas cabezas, con monofialides largas, microconidias ovaladas a elípticas constituidos por una o dos células,

macroconidias con la célula basal y la célula apical redondeadas de tres a cuatro septos; también se observó la presencia de clamidosporas con apariencia lisa o rugosa en forma individual o en pares (anexo 6). *F. proliferatum* presentó micelio en una gama de colores, del blanco-violeta con coloraciones moradas en el agar, además mostró largas cadenas de conidias en monofialides y polifialides, las microconidias exhibieron forma de mazo con la base aplanada y en algunas ocasiones se presentaron en forma de pera; además de presentarse en falsas cabezas (anexo 7). El micelio de *F. verticillioides* presentó coloraciones blancas con amarillo y/o moradas; con pigmentaciones amarillas o moradas en el agar, microconidias en falsas cabezas y en largas cadenas de conidias en monofialides, en ocasiones se observó la presencia de hifas hinchadas con una apariencia similar a las clamidosporas (anexo 8) (Barnett and Hunter, 1998; Domsch et al., 1980; Nelson et al., 1983 y Leslie and Summerell 2006). Las especies obtenidas fueron reportadas anteriormente por Ochoa, *et. al.* (2012) en semillas de ajo en el estado de Aguascalientes; a excepción de *F. proliferatum*, que fue reportada en México hasta el 2013 por Ochoa y colaboradores.

La especie encontrada con mayor frecuencia fue *F. oxysporum* con un 36.73%, estando *F. proliferatum* presente como la segunda especie con mayor presencia con 32.65%, seguido de *F. verticillioides* y *F. solani* con un 21.76% y un 8.16% respectivamente, siendo *F. acuminatum* la especie con menor aparición con un 0.68%, coincidiendo con Dissanayake *et. al.*, (2009) y Rabiei-Motlagh *et al.*, (2010) quienes reportan a *F. oxysporum* como el agente de mayor incidencia en cultivos de cebolla en Irán y Japón; además de reportar a *F. solani*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides*. Sin embargo Stankovic *et. al.*, (2007) reportan a *F. proliferatum* como la especie predominante en cultivos de ajo y cebolla en Serbia, aislando con menor frecuencia a *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. acuminatum* y *F. equiseti*. Montes-Belmont *et. al.*, (2003) reporta la presencia de *F. culmorum* en cultivares de cebolla en el estado de Morelos,

México; cabe recalcar que esta especie no fue encontrada en los muestreo realizados en este trabajo.

**Identificación molecular.** De las 147 cepas obtenidas, 46 se alinearon con los iniciadores CLOX 1 y CLOX 2 para *F. oxysporum* obteniéndose un producto de 534 pb (Gómez, 2008), 42 cepas con los iniciadores PRO1 y PRO2 para *F. proliferatum* (Rabiei-Motlagh *et al.*, 2010) 587 pb, 28 cepas como *F. verticillioides* con los iniciadores VERT 1 y VERT 2 (Dissanayake *et al.*, 2009) obteniendo un producto de la amplificación de 800 pb, 1 cepas se alinea con los iniciadores FAC F y FAC R para *F. acuminatum* (Abedi-Tizaki y Kazem Sabbagh, 2012) obteniéndose un producto de la amplificación de 600 pb y 30 con los ITS1 e ITS4.

Tabla 3. Caracterización molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS<sup>1</sup>) de los genes rDNA de las especies de *Fusarium* aisladas de semillas de ajo.

No. de aislados <sup>2</sup>	Especies identificadas	Numero de nucleótidos <sup>3</sup>	Numero de acceso <sup>4</sup>	IS <sup>5</sup>
12	<i>F. solani</i>	387	HQ829354	100%
4	<i>F. verticillioides</i>	614	HQ379695	100%
8	<i>F. oxysporum</i>	461	HQ658967	100%
6	<i>F. proliferatum</i>	500	HQ113948.1	99-100%

<sup>1</sup> Internal transcribed spacer (siglas en ingles). <sup>2</sup> No. de aislados identificados para cada especie. <sup>3</sup> Número de nucleótidos amplificados por PCR: ITS con los iniciadores ITS1- ITS4. <sup>4</sup> Base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information) <sup>5</sup> Índice de similaridad entre las secuencias de las especies aisladas y las especies comparadas.

**Pruebas de patogenicidad.** Posteriormente a la inoculación de las 35 cepas de *Fusarium* spp y el testigo, las plantas inoculadas con las cepas comenzaron a mostrar síntomas a los 15 días subsecuentes de la inoculación; como coloraciones café iniciando por la punta de las hojas, las cuales sucesivamente comenzaron a tornarse rojiza a moradas; en el punto de inoculación de algunas plantas se observó una coloración morada y los tallos presentaban una consistencia blanda (anexo 1) (Delgadillo, 2000 y Velásquez and Medina, 2004b).

El análisis de varianza mostró, que existe diferencia altamente significativa (0.1855) con un coeficiente de variación de 28.9894 (anexo 2), siendo las cepas AGS1 (*F. oxysporum*), ZAC54B (*F. oxysporum*), GTO2D (*F. oxysporum*), AGS4C (*F. proliferatum*), AGS4A (*F. oxysporum*), AGS8A (*F. proliferatum*), ZAC54A (*F. proliferatum*), ZAC13A (*F. oxysporum*), GTO54A (*F. solani*) y GTO13A-1 (*F. proliferatum*) las que mostraron mayor severidad (anexo 3); siendo que el resto de las cepas empleadas no mostraron diferencia significativa a excepción del testigo que mostro mayor diferencia significativa al resto de las plantas en la prueba, cabe mencionar que las primeras cepas en mostrar síntomas característicos de la enfermedad fueron las cepas GTO54A (*F. solani*) Y AGS1B (*F. oxysporum*). Lo anterior demuestra que hay variación patogénica entre los diversos aislados de la misma especie y dentro de la misma localidad, lo cual puede estar relacionado con la capacidad de la especie de generar los síntomas de la enfermedad de acuerdo a la variedad del hospedero (Stankovic *et. al.*, 2007). Lo cual concuerda con lo reportado por Dissanayake *et. al.*, (2009) quienes señalan algunos aislados de *F. oxysporum* como el agente con mayor índice de severidad y a su vez reportan aislados de *F. oxysporum*, *F. verticillioides* y a *F. solani* con menor capacidad patogénica.

Stankovic *et. al.*, (2007) aislaron de cebolla y ajo las siguientes especies: *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. acuminatum*; pero solo evaluaron la

patogenicidad de las cepas identificadas como *F. proliferatum* encontradas en Serbia; mostrado ser más patogénicas en cultivares de cebolla que en ajo.

## **CONCLUSIONES.**

Se identificaron morfológica y molecularmente a *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. solani* y *F. acuminatum*; siendo esta última solo encontrada en los estados de Zacatecas y Aguascalientes. Siendo las especies con mayor patogenicidad *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, y *F. solani*.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

Abedi-Tizaki, M. and Kazem Sabbagh, S. 2012. Morphological and molecular identification of Fusarium head blight isolates from wheat in north of Iran. Australian Journal Crop Science 6(9):1356-1361 (2012)

Bayraktar, H.; Türkkan, M. and Sara Dolar, F. 2010. Characterization of Fusarium oxysporum f.sp. cepae from Onion in Turkey Based on Vegetative Compatibility and rDNA RFLP Analysis. J Phytopathol 158:691–697.

Cramer, C. S. 2000. Breeding and genetics of Fusarium basal rot resistance in onion. Euphytica 115: 159–166.

Delgadillo, S. F. 2000. Enfermedades: descripción y tratamiento. El ajo en México. Origen, mejoramiento genético, tecnología de producción. Libro Técnico Núm. 3. Comps. E. Heredia G. y F. Delgadillo S. Campo Experimental Bajío-INIFAP. León, Gto., Méx. P 102.

- Dissanayake, M. L. M. C.; Kashima, R.; Tanaka y S.; Ito, S. 2009. Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted Welsh onion in Japan. *J Gen Plant Pathol* 75:37–45.
- Dugan, F. M.; Hellier, B. C.; and Lupien, S. L. 2003. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathology* 52, 426.
- FAOSTAT. 2011. Producción Mundial de Ajo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>  
Citado el 10 de noviembre de 2013.
- Galván, G. A.; Koning-Boucoiran, C. F. S.; Koopman, W. J. M.; Burger-Meijer, K.; González, P. H.; Waalwijk, C.; Kik, C.; Scholten, O. E. 2008. Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion, and resistance to *Fusarium* basal rot in related *Allium* species. *European Journal of Plant Pathology* 121:499–512.
- Gómez López, E. D.. 2008. Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. pp 256.
- Kiehr, M. y Delhey, R. 2005. *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum* como causa de podredumbre basal y muerte de plántulas de cebolla, en el sur argentino. XII Congreso Latinoamericano- XXVIII Congreso Argentino de Horticultura, Argentina pp. HV13.
- Leslie, J.F. and B.A. Summerell, 2006. The *Fusarium* Burkinafaso. laboratory manual. Blackwell Publishing, State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA.

- Martínez, G. E.; Albarracín, N.; Arcia, A.; Subero, L. y Albarracín, M. 1995. Pudrición basal del ajo causado por *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Tropical* 46(3):265-273.
- Molinero-Ruiz, L.; Rubio-Pérez, E.; González-Domínguez, E. and Basallote-Ureba, M. J. 2011. Alternative Hosts for *Fusarium* spp. Causing Crown and Root Rot of Asparagus in Spain. *J Phytopathol* 159:114–116.
- Montes-Belmont, R.; Nava-Juárez, R. A.; Flores-Moctezuma, H. E. y Mundo-Ocampo, M. 2003. Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium capa* L.) en el estado de Morelos; México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:300-304.
- Ochoa Fuentes, Y. M.; Cerna Chávez , E.; Gallegos Morales, G.; Landeros Flores, J.; Delgado Ortiz, J. C.; Hernández Camacho, S.; Rodríguez Guerra, R.; Olalde Portugal, V. 2012. Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo, en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Micología*. Pp. 27-31.
- Ochoa Fuentes, Y.M.; Delgado Ortiz, J.C.; Cerna Chávez, E.; Hernández Castillo, F.D.; Flores Olivas, A.; Gallegos Morales, G.; Vázquez Martínez, O. and Rodríguez Guerra, R. 2013. The first report of *Fusarium proliferatum* causing garlic bulb rots in Mexico. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 8(6), pp. 570-573.
- Palmero, D.; Cara, M.; Nosir, W.; Gálvez, L.; Cruz, A.; Woodward, S.; González-Jaén, M. T. and Tello, J. C. 2012. *Fusarium proliferatum* isolated from garlic in Spain: identification, toxigenic potential and pathogenicity on related *Allium* species. *Phytopathologia Mediterranea* 51, 1, 207–218.

- Rabiei-Motlagh, E.; Falahati-Rastegar, M.; Rouhani, H.; Jafarpour, B. y Jahanbakhsh, V. 2010. Root diseases of onion caused by some root colonizing fungi in Northeast of Iran. *American-Eurasian Journal Agric. And Environ. Sci.* 7 (4): 484-491.
- SAGARPA-SIAP. 2010. Secretaria de Agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación – Sistema de información agroalimentaria y pesquera. Nota informativa. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>. Consultado el 10 de noviembre de 2013.
- SAGARPA-SIAP. 2012. Secretaria de Agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación – Sistema de información agroalimentaria y pesquera. Estadística pecuaria. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>
- Schwartz, H. F y K. Mohan. 1995. *Compendium of onion and garlic diseases*. Academic Press. San Diego California. 54 p.
- Stankovic, S.; Levic, J.; Petrovic, T.; Logrieco, A. and Moretti, A. 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. *Eur J Plant Pathol* 118:165–172.
- Velásquez, V. R y Medina, A. M. M. 2004a. Guía para conocer y manejar las enfermedades más comunes de la raíz de ajo en Aguascalientes y Zacatecas. Folleto para productores No 34. Campo Experimental Pabellón-CIRNOC-INIFAP. Aguascalientes, Aguascalientes, México. 18 p.
- Velásquez-Valle, R. y Medina-Aguilar, M. M. 2004b Características vegetativas y susceptibilidad de variedades de ajo (*Allium sativum* L.) infectadas por *Fusarium* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:435-438.



## LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 2005. Plant pathology. Fifth Edition. Amsterdam. Elsevier Academic Press. P 992.
- Alvarado, M. S. 1987. Estudio de las enfermedades fungosas del ajo (*Allium sativum* L.) en Zacatlán, Puebla. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 53 p.
- American Phytopathological Society. 1995. Compendium of onion and garlic diseases. H. F. Schwartz and S. K. Mohan (Eds.). The APS Press. St. Paul, MN, USA. 54 p.
- Arévalo V. A., Montes P.H., Narro S.J. y Redondo J. E. 2002. Los patógenos y su efecto en la reducción del potencial de rendimiento y calidad del ajo. CEBAJ-INIFAP. 2003. Gto. México. Pp.73.
- Burba J. L. 2006 Producción de semilla de sanidad controlada en hortalizas de propagación agamica. Curso Taller en tecnología de producción de semillas Hortícolas para pequeños agricultores. FAO-INTA. P 245-250.
- Cabrera, C. y P. Elliot. 1996. La cabeza que solo tiene dientes. Primer Encuentro sobre agricultura urbana y su impacto en la alimentación de la comunidad. Se puede 1(5); 22-23.

- Chávez C.M. 2010. Ajo. Guía técnica para el área de influencia del Campo Experimental Costa de Hermosillo. P. 97-112.
- Conles M.Y., Cragolini C.I., Yossen V.E., Balzarini M. y Macchiavelli R.E.2011. Estimación de curvas de progreso de la incidencia de podredumbre blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) en cultivos de ajo mediante un modelo no lineal mixto. Agriscientia. Vol.XXVII:61-74.
- Davis, R. M., Hao, J. J., Romberg, M. K., Nunez, J. J., and Smith, R. F. 2007. Efficacy of germination stimulants of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* for management of white rot garlic. Plant Disease 91:204-208.
- Díaz de Castro, F. J.; Restrepo, M. A.; Rojas, W. 2007. Microbiología de las infecciones en plantas. Primera edición. Corporación para las investigaciones Biológicas. Medellín Colombia P 102-105.
- Espinosa, P. M., Enríquez, R. S., González, C. M., Ramos, N. J.M. 2003. Cadena Agroalimentaria de Ajo. Pp 12-15.
- Everhart E., Haynes C. y Jauron R.2003.Guia de Horticultural de Iowa State University. Traducción. Pp. 2.
- Heredia, G. E. 2000. Importancia del cultivo. In: El ajo en México. Origen, mejoramiento genético, tecnología de producción. Libro Técnico Núm. 3. Comps. E. Heredia G. y F. Delgadillo S. Campo Experimental Bajío. INIFAP. León, Gto., México. 102 p.
- Hernández A. A. M., Juárez L. G., Fucikovsky Z. L., Zavaleta M. E. y González H. V. A. 2006. Impacto del almacenamiento en la brotación de bulbos de ajo y especies patogénicas de *Penicillium* y *Erwinia* asociadas. Revista Fitotecnia Mexicana 29:283-290.

- Izquierdo O. H. 2006. Instructivo Técnico para la producción de Ajo-Semilla de Alta Calidad Fitosanitaria Mediante el empleo de Técnicas Biotecnológicas. Temas de Ciencia y Tecnología. 10: 63.
- Mena C. J. 2006. Manejo integrado de plagas: una propuesta para el cultivo de ajo. Programa y Memorias. II Foro Nacional de Ajo. Zacatecas, México. 124 p.
- Mendoza, Z. C. 1999b. Enfermedades fungosas de hortalizas y fresa. p. 25-63. In: Hortalizas. Plagas y enfermedades. Ed. Trillas. México, D. F. 544.
- Mendoza, Z. C. y Pinto, C. B. 1985c. Principios de Fitopatología y enfermedades causadas por hongos. Universidad Autónoma Chapingo. Imprenta Universitaria, Chapingo, México.311.
- Montes B. R., Nava J. R. A., Flores M. H. E. y Mundo O. M. 2003. Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en el estado de Morelos, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21:300-304.
- Olvera J.G., Sánchez R. R., Ochoa B. R., Rodríguez C. F., Roque Z J., Ortega R. C., Palacios F.M. y Carrillo T. L. A. 1991. Más allá de nuestro campo. Claridades Agropecuarias. México. P 32.
- Ortodena, M.; Guarro, J.; Madrid, M.; Caracuel, Z.; Ronchero, M. I.; Mayayo, E.; 2004. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. Infection and Immunity 72: 1760-1766.
- Pal, S. T. y M.W. Platt. 1995. Antifungal effects of *Allium sativum* (garlic) extract against the *Aspergillus* sp. Involved in otomycosis. Lett Appl. Microbiol. 20:14-18.

- Quiroz S. V. F., C. R. Ferrera, A. Alarcón, H. M. E. Lara, 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Revista Mexicana de Micología* 26: 27-34.
- Ravi Sankar N. 2012. First Report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs (*Allium sativum*) in India. *Plant Disease* 9 290.
- Reveles H. M., Velásquez V. R. y Bravo L. A. G. 2009. Tecnología para cultivar ajo en Zacatecas. Libro Técnico No. 11. Campo Experimental Zacatecas – INIFAP. Calera de V. R., Zacatecas, México. P. 272.
- Reveles, H. M. y Rubio, D. S. 2006. Panorámica del ajo y su cultivo en Zacatecas (primera parte). *Zacatecas en la producción* 1:Pp. 3-5.
- Rivas J. C. 1999. Efecto genotipo-ambiente sobre la infección natural de moho azul *Penicillium corymbiferum* (Westling) en ajo “colorado”. VI Curso/Taller sobre producción, comercialización e industrialización de ajo. INTA. Mendoza, Argentina. 71-72.
- Rojas V., Ulacio D., Jiménez M.A., Perdomo W. y Pardo A.2010. Análisis epidemiológico y control de *Sclerotium cepivorum* Berk. Y la Pudrición Blanca en Ajo. *Bioagro*.22: 185-192.
- Rojas, V.; Ulacio, D.; Jiménez, M. A.; Perdomo, W.; Pardo, A. 2010. Análisis epidemiológico y control de *Sclerotium cepivorum* Berk. y la pudrición blanca en ajo. *Bioagro* 22(3): 185-192.
- Sommerville, P. A., Hall, D. H., and Greathead, A. S. 1984. Dry rot of garlic caused by *Botrytis porri* Buchw. *Phytopathology* 74:829.

Vázquez A. B. 2012. Desinfección de dientes de ajo. De Riego: Protección y Nutrición de Hortalizas y Frutas. 63: 46- 48.

Velásquez, V. R. y Amador, R. M. D. 2009. Enfermedades bióticas de ajo y chile en Aguascalientes y Zacatecas. Libro Técnico No. 9. Campo Experimental Zacatecas CIRNOC-INIFAP. P. 187.

Velásquez, V. R., Reveles, H. M. y Medina, A. M. M. 2011. Ecología del hongo causante de la pudrición blanca del ajo y la cebolla y saneamiento de parcelas infestadas. Folleto Técnico No. 32. Campo Experimental Zacatecas, CIRNOC-INIFAP, 24 p.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Valores obtenidos en la patogenicidad en base a la escala propuesta por Velásquez y Medina (2004b)

ESPECIE	NOMBRE	No. REP	VALOR ESCALA
F. solani	GTO 37 B	Rep 1	5
F. solani	GTO 37 B	Rep 2	3
F. solani	GTO 37 B	Rep 3	3
F. solani	GTO 37 B	Rep 4	5
F. oxysporum	AGS 1 A	Rep 1	5
F. oxysporum	AGS 1 A	Rep 2	3
F. oxysporum	AGS 1 A	Rep 3	5
F. oxysporum	AGS 1 A	Rep 4	5
F. proliferatum	ZAC 1 A	Rep 1	3
F. proliferatum	ZAC 1 A	Rep 2	3
F. proliferatum	ZAC 1 A	Rep 3	5
F. proliferatum	ZAC 1 A	Rep 4	5
F. solani	GTO12A	Rep 1	3
F. solani	GTO12A	Rep 2	3
F. solani	GTO12A	Rep 3	5
F. solani	GTO12A	Rep 4	5
F. oxysporum	AGS4A	Rep 1	5
F. oxysporum	AGS4A	Rep 2	3
F. oxysporum	AGS4A	Rep 3	5
F. oxysporum	AGS4A	Rep 4	5
F. proliferatum	ZAC 21B	Rep 1	5
F. proliferatum	ZAC 21B	Rep 2	3
F. proliferatum	ZAC 21B	Rep 3	3
F. proliferatum	ZAC 21B	Rep 4	5

---

F. solani	GTO54A	Rep 1	5
F. solani	GTO54A	Rep 2	3
F. solani	GTO54A	Rep 3	5
F. solani	GTO54A	Rep 4	5
F. oxysporum	AGS 1B	Rep 1	5
F. oxysporum	AGS 1B	Rep 2	3
F. oxysporum	AGS 1B	Rep 3	3
F. oxysporum	AGS 1B	Rep 4	3
F. proliferatum	ZAC54A	Rep 1	5
F. proliferatum	ZAC54A	Rep 2	3
F. proliferatum	ZAC54A	Rep 3	5
F. proliferatum	ZAC54A	Rep 4	5
F. oxysporum	GTO 1D	Rep 1	5
F. oxysporum	GTO 1D	Rep 2	5
F. oxysporum	GTO 1D	Rep 3	3
F. oxysporum	GTO 1D	Rep 4	3
F. proliferatum	AGS 4C	Rep 1	5
F. proliferatum	AGS 4C	Rep 2	5
F. proliferatum	AGS 4C	Rep 3	3
F. proliferatum	AGS 4C	Rep 4	5
F. verticillioides	ZAC 124A	Rep 1	5
F. verticillioides	ZAC 124A	Rep 2	3
F. verticillioides	ZAC 124A	Rep 3	3
F. verticillioides	ZAC 124A	Rep 4	5
F. oxysporum	GTO 6B	Rep 1	5
F. oxysporum	GTO 6B	Rep 2	5
F. oxysporum	GTO 6B	Rep 3	3
F. oxysporum	GTO 6B	Rep 4	3
F. proliferatum	AGS 9A-1	Rep 1	5
F. proliferatum	AGS 9A-1	Rep 2	5
F. proliferatum	AGS 9A-1	Rep 3	3

---

---

F. proliferatum	AGS 9A-1	Rep 4	3
F. verticillioides	ZAC 75A-2	Rep 1	5
F. verticillioides	ZAC 75A-2	Rep 2	3
F. verticillioides	ZAC 75A-2	Rep 3	5
F. verticillioides	ZAC 75A-2	Rep 4	3
F. oxysporum	GTO 2D	Rep 1	5
F. oxysporum	GTO 2D	Rep 2	3
F. oxysporum	GTO 2D	Rep 3	5
F. oxysporum	GTO 2D	Rep 4	5
F. proliferatum	AGS 8A	Rep 1	5
F. proliferatum	AGS 8A	Rep 2	3
F. proliferatum	AGS 8A	Rep 3	5
F. proliferatum	AGS 8A	Rep 4	5
F. verticillioides	ZAC 43B	Rep 1	5
F. verticillioides	ZAC 43B	Rep 2	3
F. verticillioides	ZAC 43B	Rep 3	3
F. verticillioides	ZAC 43B	Rep 4	5
F. verticillioides	GTO 1A	Rep 1	5
F. verticillioides	GTO 1A	Rep 2	3
F. verticillioides	GTO 1A	Rep 3	5
F. verticillioides	GTO 1A	Rep 4	3
F. acuminatum	AGS Y-10	Rep 1	5
F. acuminatum	AGS Y-10	Rep 2	3
F. acuminatum	AGS Y-10	Rep 3	5
F. acuminatum	AGS Y-10	Rep 4	3
F. oxysporum	ZAC13 A	Rep 1	5
F. oxysporum	ZAC13 A	Rep 2	3
F. oxysporum	ZAC13 A	Rep 3	5
F. oxysporum	ZAC13 A	Rep 4	5
F. verticillioides	GTO 10B	Rep 1	5
F. verticillioides	GTO 10B	Rep 2	3

---



---

F. verticillioides	GTO 10B	Rep 3	3
F. verticillioides	GTO 10B	Rep 4	3
F. solani	AGS 8C-1	Rep 1	5
F. solani	AGS 8C-1	Rep 2	3
F. solani	AGS 8C-1	Rep 3	3
F. solani	AGS 8C-1	Rep 4	5
F. oxysporum	ZAC 54B	Rep 1	5
F. oxysporum	ZAC 54B	Rep 2	5
F. oxysporum	ZAC 54B	Rep 3	5
F. oxysporum	ZAC 54B	Rep 4	3
F. verticillioides	GTO 58A	Rep 1	5
F. verticillioides	GTO 58A	Rep 2	3
F. verticillioides	GTO 58A	Rep 3	3
F. verticillioides	GTO 58A	Rep 4	3
F. verticillioides	AGS 31B-1	Rep 1	5
F. verticillioides	AGS 31B-1	Rep 2	5
F. verticillioides	AGS 31B-1	Rep 3	3
F. verticillioides	AGS 31B-1	Rep 4	3
F. oxysporum	ZAC 66C	Rep 1	3
F. oxysporum	ZAC 66C	Rep 2	5
F. oxysporum	ZAC 66C	Rep 3	5
F. oxysporum	ZAC 66C	Rep 4	3
F. proliferatum	GTO 13A-1	Rep 1	3
F. proliferatum	GTO 13A-2	Rep 2	5
F. proliferatum	GTO 13A-3	Rep 3	5
F. proliferatum	GTO 13A-4	Rep 4	5
F. verticillioides	AGS 32B-2	Rep 1	5
F. verticillioides	AGS 32B-3	Rep 2	3
F. verticillioides	AGS 32B-4	Rep 3	3
F. verticillioides	AGS 32B-5	Rep 4	3
F. solani	ZAC 52A	Rep 1	3

---

---

F. solani	ZAC 52A	Rep 2	5
F. solani	ZAC 52A	Rep 3	5
F. solani	ZAC 52A	Rep 4	3
F. proliferatum	GTO 10A-2	Rep 1	3
F. proliferatum	GTO 10A-3	Rep 2	5
F. proliferatum	GTO 10A-4	Rep 3	5
F. proliferatum	GTO 10A-5	Rep 4	3
F. verticillioides	AGS 8B	Rep 1	3
F. verticillioides	AGS 8B	Rep 2	5
F. verticillioides	AGS 8B	Rep 3	3
F. verticillioides	AGS 8B	Rep 4	5
F. acuminatum	ZAC23A	Rep 1	3
F. acuminatum	ZAC23A	Rep 2	3
F. acuminatum	ZAC23A	Rep 3	5
F. acuminatum	ZAC23A	Rep 4	3
F. proliferatum	GTO 1B-1	Rep 1	5
F. proliferatum	GTO 1B-2	Rep 2	3
F. proliferatum	GTO 1B-3	Rep 3	3
F. proliferatum	GTO 1B-4	Rep 4	5
F. acuminatum	ZAC 119A	Rep 1	5
F. acuminatum	ZAC 119A	Rep 2	5
F. acuminatum	ZAC 119A	Rep 3	3
F. acuminatum	ZAC 119A	Rep 4	3
Test	TEST	Rep 1	1
Test	TEST	Rep 2	1
Test	TEST	Rep 3	1
Test	TEST	Rep 4	1

---

**ANEXO 2. Análisis de varianza de las pruebas de patogenicidad en  
invernadero**

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Suma de cuadrados medios</b>	<b>F- valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Modelo</b>	35	50.9722222	1.4563492	1.26	0.1855
<b>Error</b>	108	125.0000000	1.1574074		
<b>Total correcto</b>	143	175.9722222			

<b>R- cuadrado</b>	<b>Coef var</b>	<b>Raiz MSE</b>	<b>Sev Media</b>
<b>0.289661</b>	26.98963	1.075829	3.986111

\*Nivel de significancia 0.05.

**ANEXO 3. Prueba de comparación de media de Tukey de las pruebas de patogenicidad en invernadero**

<b>TURKEY</b>	<b>MEDIA</b>	<b>CEPA</b>
<b>A</b>	4.5000	AGS1
<b>A</b>	4.5000	ZAC54B
<b>A</b>	4.5000	GTO2D
<b>A</b>	4.5000	AGS4C
<b>A</b>	4.5000	AGS4A
<b>A</b>	4.5000	AGS8A
<b>A</b>	4.5000	ZAC54A
<b>A</b>	4.5000	ZAC13A
<b>A</b>	4.5000	GTO54A
<b>A</b>	4.5000	GTO13A-1
<b>B A</b>	4.0000	ZAC75A-2
<b>B A</b>	4.0000	AGS8B
<b>B A</b>	4.0000	AGS9A-1
<b>B A</b>	4.0000	GTO10A-2
<b>B A</b>	4.0000	GTO12A
<b>B A</b>	4.0000	GTO1A
<b>B A</b>	4.0000	AGS8C-1
<b>B A</b>	4.0000	GTO1D
<b>B A</b>	4.0000	AGS31B-1
<b>B A</b>	4.0000	GTO37B
<b>B A</b>	4.0000	ZAC21B
<b>B A</b>	4.0000	ZAC124A
<b>B A</b>	4.0000	GTO6B
<b>B A</b>	4.0000	ZAC52A
<b>B A</b>	4.0000	ZAC119A

---

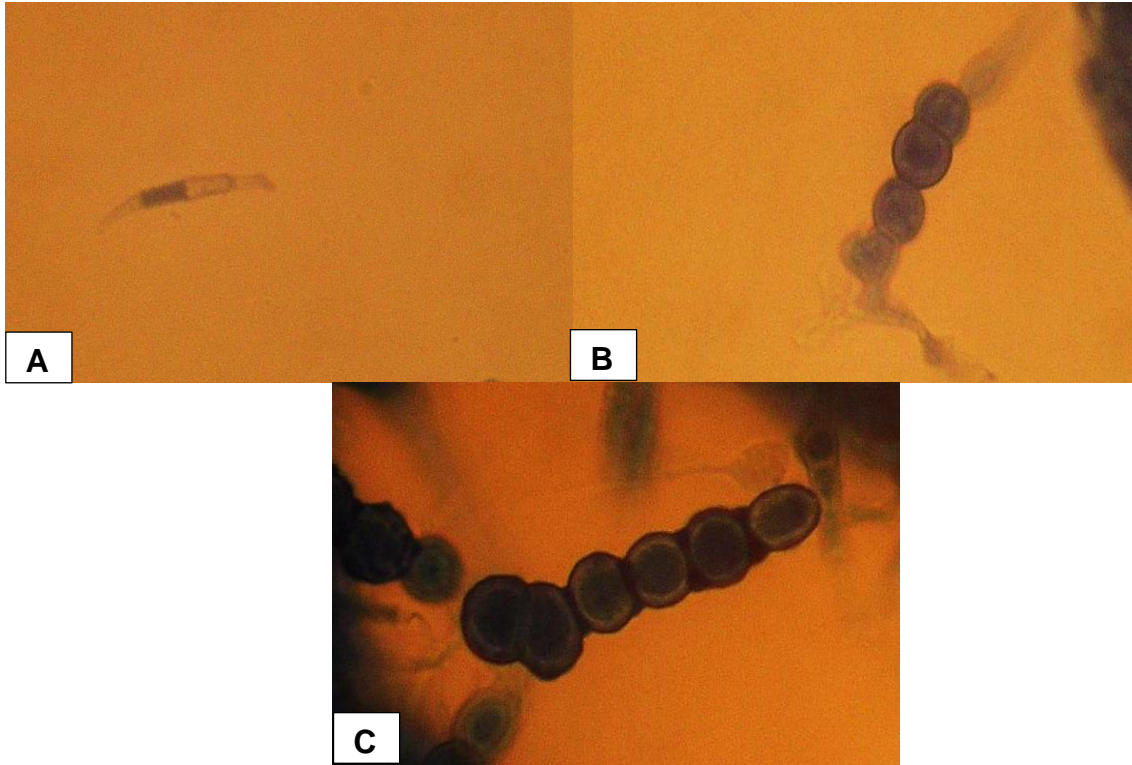
<b>B A</b>	4.0000	ZAC1A
<b>B A</b>	4.0000	AGSY-10
<b>B A</b>	4.0000	GTO1B-1
<b>B A</b>	4.0000	ZAC43B
<b>B A</b>	4.0000	ZAC66C
<b>B A</b>	3.5000	GTO58A
<b>B A</b>	3.5000	ZAC23A
<b>B A</b>	3.5000	AGS32B-2
<b>B A</b>	3.5000	AGS1B
<b>B A</b>	3.5000	GTO10B
<b>B</b>	1.0000	TEST

---

\*Nivel de significancia 0.05.

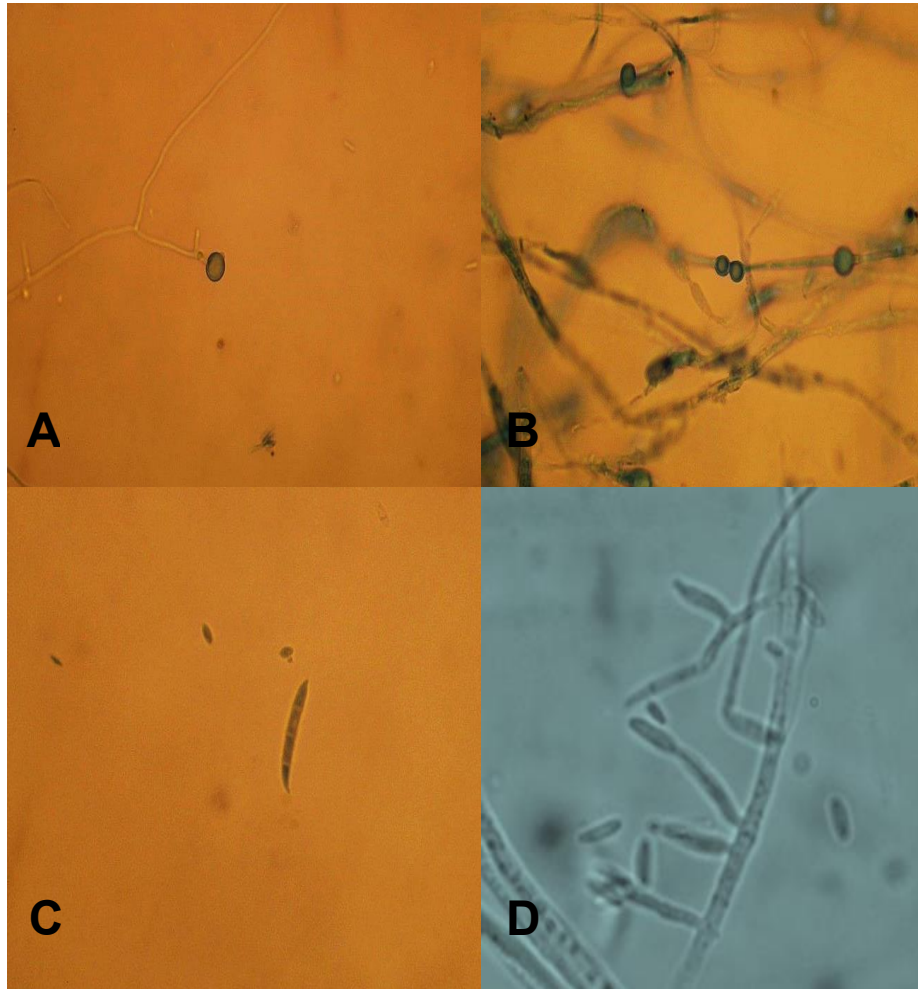
Valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

ANEXO 4



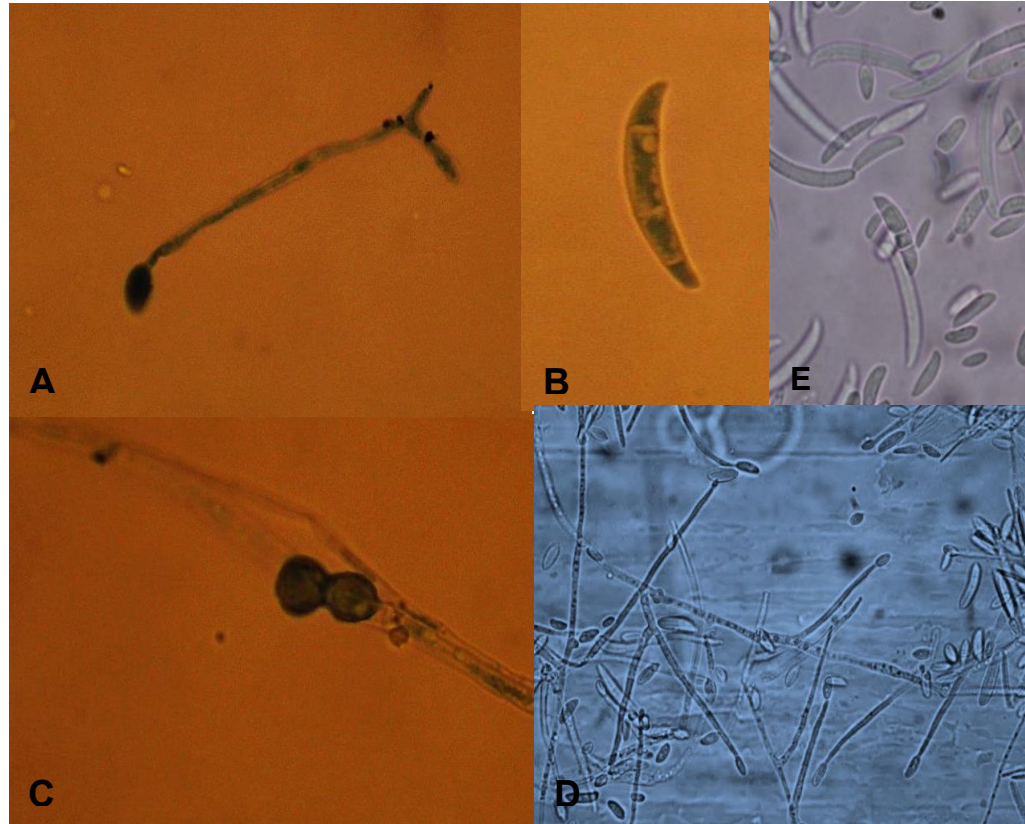
*F. acuminatum*. A: Macroconidia, B y C: Clamidosporas en cadena.

## ANEXO 5



**Estructuras de *F. oxysporum*. A: Clamidospora, B: Clamidosporas en pares, C: Macroconidia y D: Monofialide.**

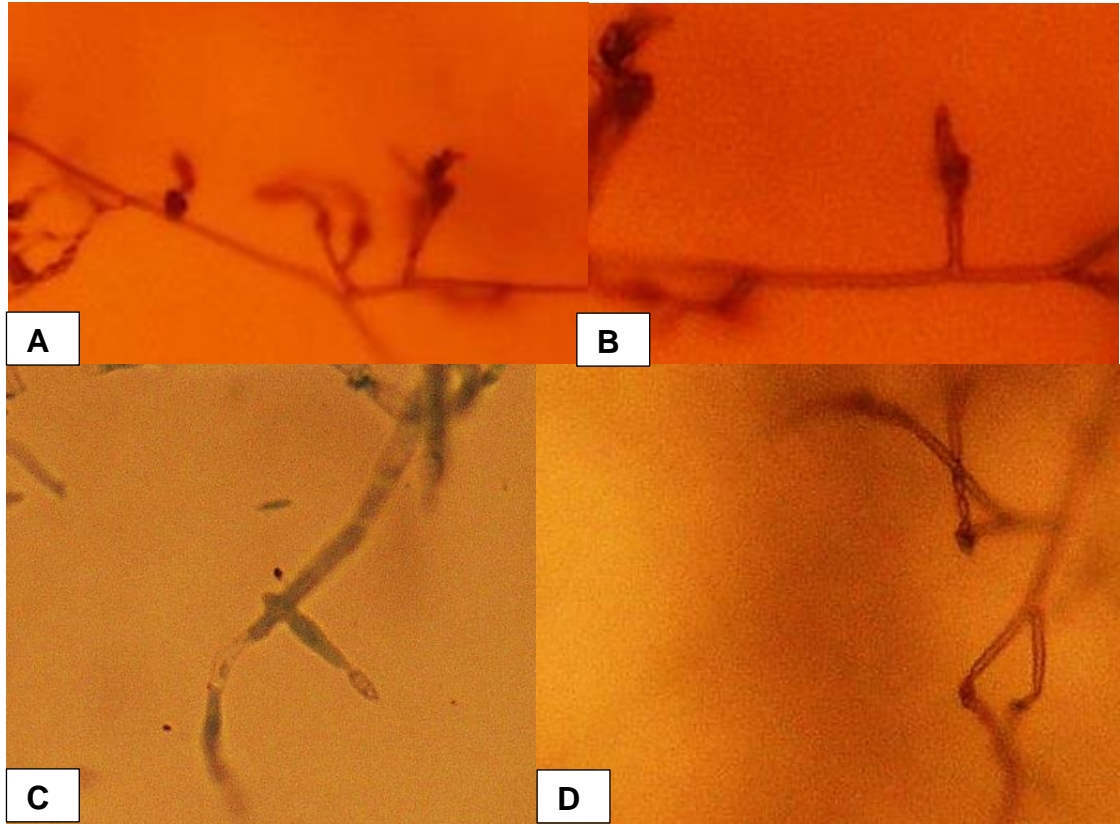
## ANEXO 6



***F. solani*. A: Monofialide, B y E: Macroconidia, C: Clamidosporas y D: Conidias unidas a su monofialide.**

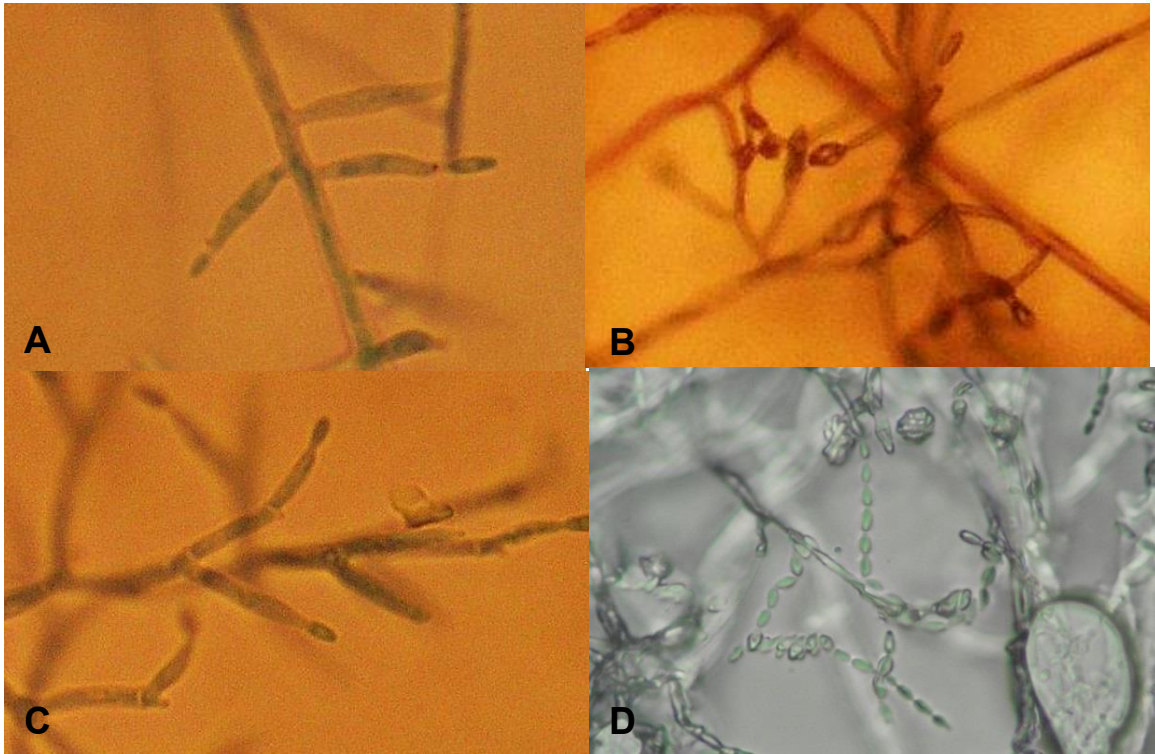


## ANEXO 7



***F. proliferatum*. A y D: Conidias en monofialides B y C: Conidias en polifialides**

## ANEXO 8



***F. verticillioides*. A y C: Conidias unidas a monofialides y B: Falsas cabezas y D: Conidias en cadena.**